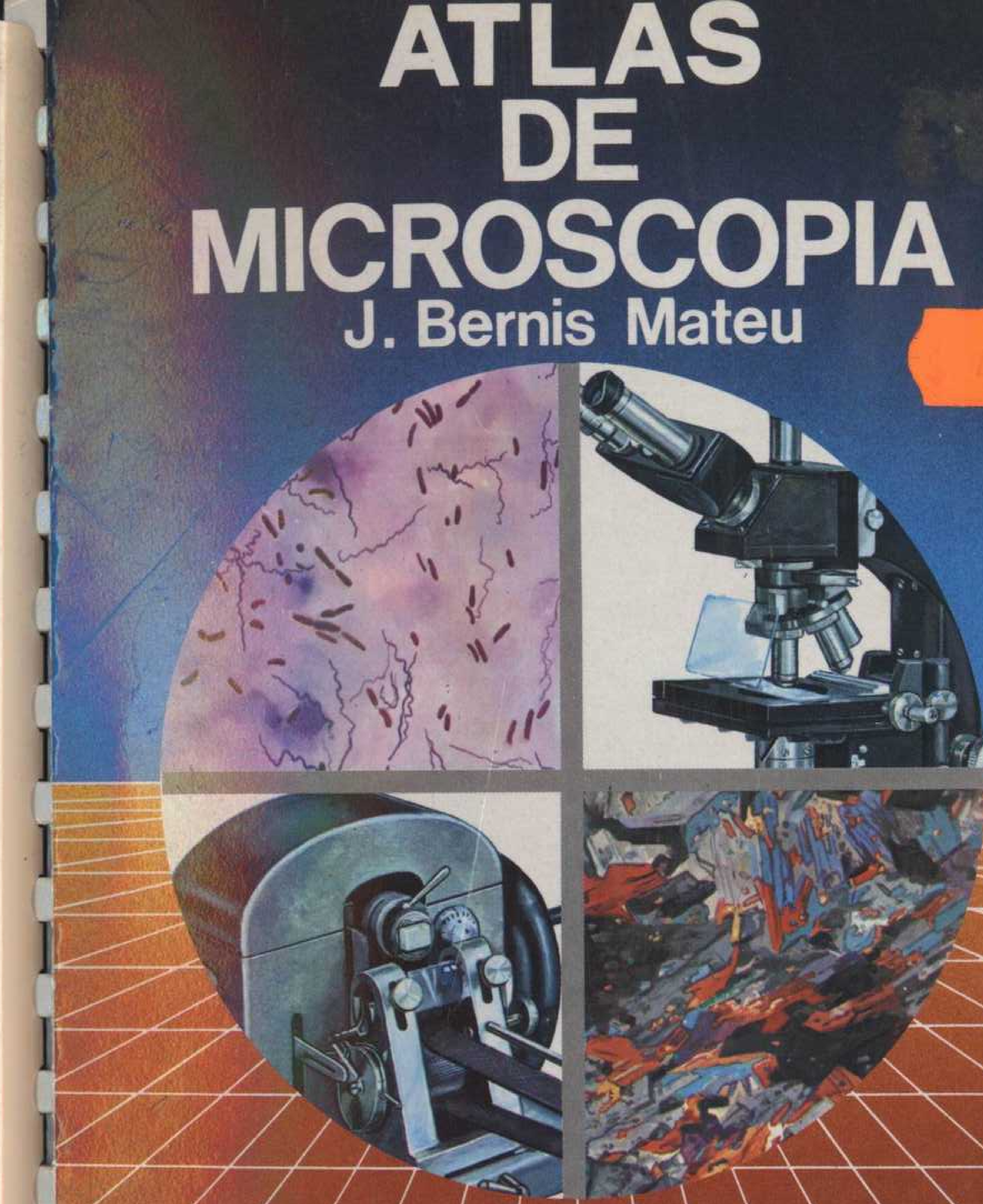


EDICIONES
JOVER



EDICIONES JOVER, S. A.- BARCELONA



Nueva edición modificada

Edición 1992

Printed in Spain
© Ediciones Jover
ISBN 84-7093-138-5 Depósito Legal: B. 1034-92

Es una publicación de Ediciones Jover, S.A.
San Pedro Mártir, 18 - 08012 Barcelona

Imgesa - Alarcón, 138-140 - San Adrián de Besós (Barcelona)

PRÓLOGO

La Microscopía es una ciencia que va adquiriendo, día a día, mayor importancia. Se sirven de ella las principales ramas de la actividad humana: arte, ciencia, agricultura, industria... El microscopio es el principal elemento en todos los laboratorios de investigación. Es un instrumento indispensable.

Ello nos ha inducido a redactar este Atlas, con el que pretendemos iniciar a estudiantes, aficionados y, en general, a cuantos se sientan inclinados hacia esta ciencia, en el conocimiento y manejo del microscopio.

Una parte de este trabajo está consagrada al instrumento en sí: historia, funcionamiento, empleo. En capítulos sucesivos pasamos revista a las aplicaciones del microscopio, así como a la forma de preparar los materiales de estudio para ser observados en las mejores condiciones posibles.

Confiamos en haber conseguido nuestro propósito, que, repetimos, solamente es iniciar e interesar. Por ello no hemos querido hacer demasiado ardua la lectura de esta obra y hemos evitado sobrecargarla con la exposición de técnicas que el estudioso, una vez iniciado en la materia, encontrará en obras más especializadas.

Expreso mi agradecimiento al doctor don Benito Oliver Suñé, eminente bacteriólogo, que, con sus enseñanzas y consejos, ha hecho posible la aparición de este Atlas. Mi agradecimiento también a editores, ilustradores y a todos los que han contribuido a su realización.

El Autor

FUNDAMENTOS E HISTORIA DEL MICROSCOPIO

FUNDAMENTOS ÓPTICOS

El microscopio es un instrumento que permite observar objetos no perceptibles a simple vista. Ello se consigue mediante un sistema óptico compuesto por lentes de cristal que, al ser atravesadas por la imagen del objeto, la amplifican.

No creemos necesario extendernos en consideraciones acerca de las propiedades y comportamiento de las lentes, que el lector podrá consultar en cualquier tratado elemental de Física y cuyo estudio no entra en los límites que hemos dado a esta obra. Solamente indicaremos que, según el número y posición de las lentes, distinguiremos entre microscopio simple y microscopio compuesto.

MICROSCOPIO SIMPLE

Damos el nombre de microscopio simple a todas aquellas lentes con montura o sin ella, gruesas o pequeñas, biconvexas o plano-convexas, que nos amplifiquen los objetos. Corrientemente se les llama lupas. Existen numerosos modelos y variedades.

Podemos, pues, decir que cualquier lente convergente utilizada de manera que dé una imagen virtual, y, por lo tanto, directa y mayor que el objeto, es un microscopio simple (figs. 1, 2 y 3). Las lupas solamente se diferencian en la montura. Su manejo es muy sencillo, y se limita a orientar la lente de manera que su cara plana o menos curvada quede dirigida hacia el objeto y colocarla a tal distancia que éste quede situado entre el foco y el vértice y tanto más próximo a aquél cuanto mayor se quiera la imagen. (Fig. 4.)

El aumento que se obtiene con estas lentes es del orden de los 50 diámetros. Para conseguir aumentos un poco mayores, se aproximan más o menos, unas a otras, dos o tres lentes. Se emplea este sistema para la observación y disección de tejidos, para la observación de mezclas, y se logran con él aumentos hasta de 100 diámetros.

MICROSCOPIO COMPUESTO

Está constituido por la combinación de dos sistemas de lentes convergentes: uno, próximo al ojo del observador, por lo cual se le llama ocular, y que actúa como microscopio simple; otro, próximo al objeto, y denominado objetivo. (Fig. 5.) Éste es el verdadero microscopio, el que estamos acostumbrados a ver en todos los laboratorios.

No se crea que con los modelos sencillos no es posible obtener buenos aumentos y realizar excelentes observaciones, pues, salvo para estudios muy especializados, que requieren grandes aumentos, un microscopio corriente nos bastará para pasar horas muy agradables y nos permitirá observar toda clase de materiales. Y anotemos bien que, por muchas y variadas que sean sus lentes, cualquiera que sea su potencia, el principio siempre es el mismo: basta colocar el objetivo de manera que el objeto se encuentre más allá del foco, pero lo más cerca posible de él, para que la imagen que nos de sea real y del mayor tamaño posible; si el ocular se coloca de manera que la imagen real obtenida por el objetivo quede situada entre el vértice y el foco del ocular, se obtendrá una imagen virtual directa de la obtenida por el objetivo y mayor que ella. Se verá, pues, una imagen virtual invertida y sumamente aumentada del objeto. (Figs. 6 y 7.)

Cuanto mayores sean curvatura de las lentes y distancia entre el sistema objetivo y sistema ocular (longitud óptica), mayor será el aumento total.

Así, pues, vemos que el microscopio compuesto tiene dos sistemas de aumentos: el ocular y el objetivo. Para calcular el aumento total de un microscopio, tendremos que multiplicar, pues, el aumento propio del objetivo por el aumento del ocular.

Los aumentos obtenidos con los microscopios compuestos son del orden de los 1.000 a los 3.000 diámetros, aunque esto dependa casi exclusivamente de la potencia de los objetivos. Con objetivos en seco para observaciones histológicas, bastarán aumentos de 500 a 1.000 diámetros.

HISTORIA

El nombre microscopio (*mikrós*, pequeño, y *skopéoo*, observar) se debe a Jean Faber, miembro de la antigua Academia de los Lincei (1624). Este término designa un microscopio compuesto por un objetivo y un ocular, aunque en la práctica se haya hecho extensivo a todos los instrumentos amplificantes simples y compuestos.

El uso de las lupas se remonta, en sus orígenes conocidos, a la civilización asiria. En las ruinas de Nínive se encontró un cristal de roca tallado en forma de lente plano-convexa.

Los romanos conocían ya el poder amplificador de las lentes biconvexas. En las ruinas de Pompeya y de Herculano se hallaron cristales convexos.

FUNDAMENTOS OPTICOS

Fig. 1. — Lupa llamada "cuentahilos"

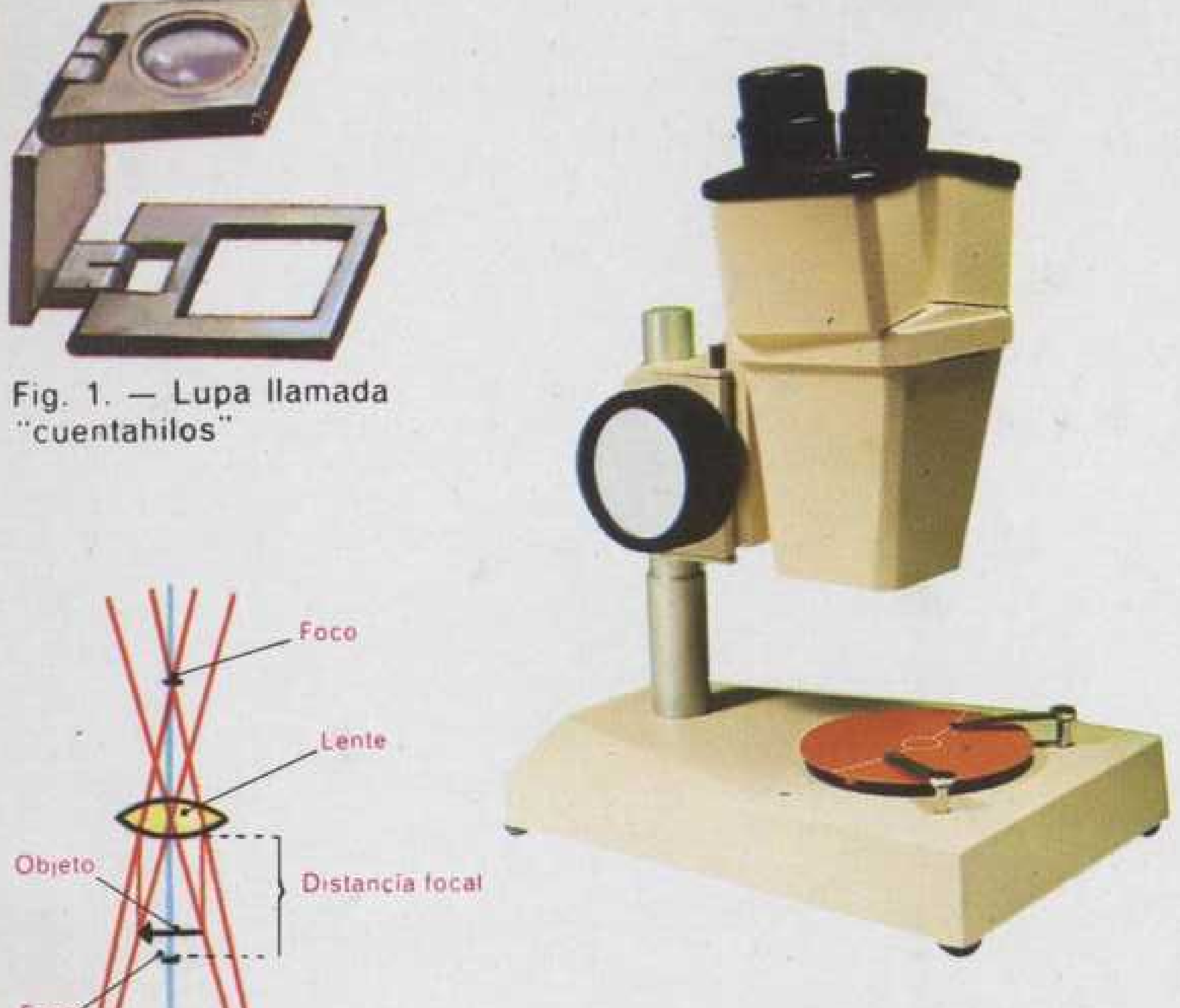


Fig. 2.– Lupa binocular.



Fig. 3. — Lupa de mano.

Foco
Lente
Objeto
Distancia focal
Foco
Imagen del objeto

Fig. 4. — Esquema de la marcha de los rayos luminosos en el microscopio simple.

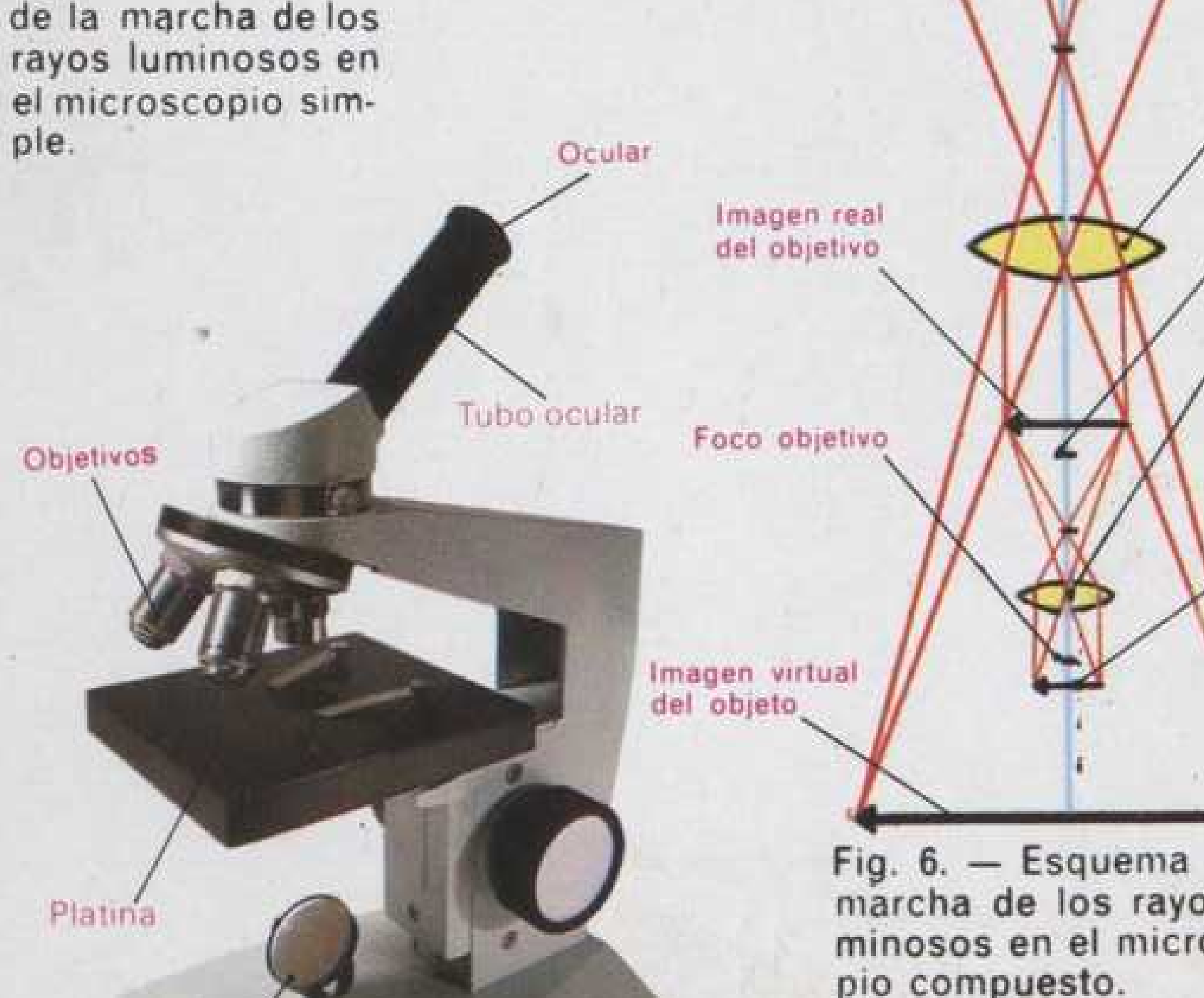




Fig 5.— Microscopio compuesto

Lente ocular
Imagen real del objetivo
Foco ocular
Lente objetivo
Foco objetivo
Objeto
Imagen virtual del objeto

Fig. 6. — Esquema de la marcha de los rayos luminosos en el microscopio compuesto.

Distancia de la visión distinta
Longitud óptica
Ocular
Objetivo
Objeto
Imagen de objeto
Condensador
Espejo

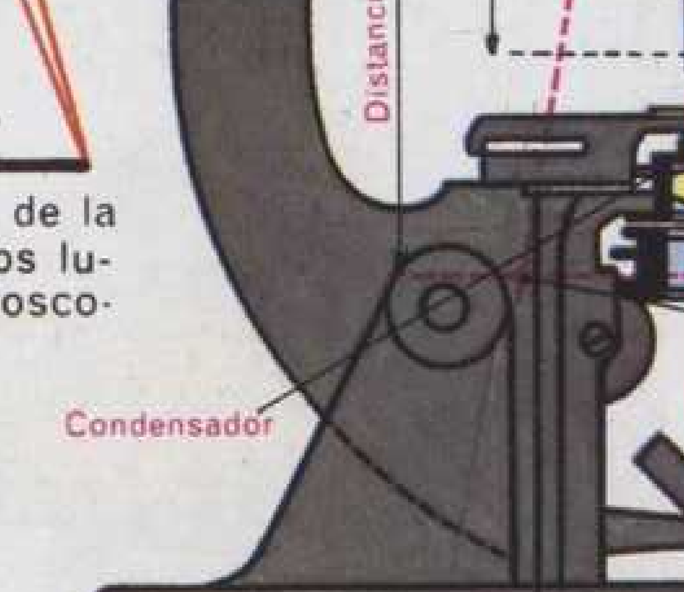


Fig. 7. — Corte esquemático de un microscopio compuesto.

Séneca y Plinio cuentan que Nerón contemplaba a través de una esmeralda tallada los combates de los gladiadores: «Nero princeps gladiatorum pugnas spectabat in smaragdo». Suponemos, pues, que les era conocido su empleo para corregir la miopía.

Según Séneca y Aristófanes, los médicos griegos y romanos utilizaban, por su poder de ampliación, bolas de vidrio llenas de agua para observar los tejidos enfermos.

Es preciso llegar al siglo XI para hallar, en los libros del árabe Alhazen ben Alhazen, referencias a las lentes convexas. En el siglo XIII, Roger Bacon señala las propiedades de las lentes biconvexas. Con el concurso de lentes, Georges Haefnagel (1546-1617) estudia los insectos y publica un trabajo ilustrado con sus observaciones.

El verdadero impulsor de la Microscopía fue, sin duda, el holandés Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) (fig. 2), nacido y muerto en Delft. Construía microscopios con lentes muy convexas que él mismo pulía y con las cuales realizó observaciones muy diversas, adquiriendo gran renombre como anatomista y fisiólogo. Estudió la composición de la sangre y completó los estudios de Harvey acerca de la circulación capilar. Fue el primero que observó y dibujó los protozoos (1674). Dos años más tarde descubrió las bacterias, y sus primeros dibujos fueron reproducidos en las *Transacciones filosóficas de la Real Sociedad de Londres*, en 1683.

Los primeros microscopios simples construidos durante estos años por Hartsoeker, en 1662; Leeuwenhoek (figura 3), en 1664; Wilson, en 1702; Joblot, en 1716, constaban solamente de una lente que se sostenía con la mano y se dirigía hacia la fuente de luz para que ésta atravesara la lente y el objeto.

Como dato curioso, citaremos los ensayos realizados por Brewster y por Goring, en Inglaterra, con diamantes y zafiros tallados en forma de lente. En Francia, Charles Chevalier tallaba topacios y granates. Todos estos cristales, con fuerte refracción, dispersión reducida y ligera curvatura, daban ampliaciones notables, pero tuvieron que ser abandonados por dificultades de talla y elevado precio.

Como las difracciones y las aberraciones de las imágenes eran muy acentuadas, el examen de un ocular astronómico dio a W. de Hyde Wollastone (1766-1826) la idea de aplicarlo al microscopio. Consiste este ocular en dos lentes más o menos separadas, en algunas ocasiones con líquidos entre ambas, que permiten reducir las aberraciones al mismo tiempo que dan mejores ampliaciones. Este sistema se llama *doblete*. (Fig. 7.)

Varias modificaciones de dobletes, debidas a Brewster, Charles, Lord Stanhope, Divini etc., obtuvieron relativo éxito, lográndose con ellas notables ampliaciones de 40 a 100 diámetros. Los dobletes pueden montarse en un estativo especial; esta disposición, imaginada por Wilson en 1702, y más o menos modificada por obra de Joblot y Swammerdan, persistirá hasta los alrededores del año 1910.

El descubrimiento del microscopio compuesto es contemporáneo del de las lupas y tuvo un precedente en las mencionadas bolas llenas de agua amplificadoras. Los más antiguos conocidos se deben a Galileo y a Janssen, aunque hay unanimidad en considerar a Zacarías Janssen (fig. 1) como el primer constructor, en 1590, del microscopio compuesto. Janssen nació en Midleburg y era hijo de un tallador de cristales.

Es a partir de principios del siglo XVII cuando el microscopio sufre modificaciones interesantes, no sólo en lo que concierne a la óptica, sino también en lo que se refiere a la mecánica: el microscopio de Hooke (1667), con bola de vidrio condensadora de los rayos luminosos (fig. 6); el de trípode, de Griendl von Asch (1687) (figura 5); el de Bonnani (1691), de columna; el de Joblot (1716) (fig. 4), con cristal de campo, etc. son otros tantos modelos de los muchos que por aquellos años se construyeron. Quizá sería interesante citar el mocroscopio de Cuff-Baker (1744), aparato de columna con movimiento rápido y movimiento micrométrico, además de espejo fijo para concentrar la luz.

Todos estos aparatos, a pesar de lograr buenas ampliaciones, daban imágenes muy defectuosas a causa de las aberraciones cromáticas y esféricas, y así muchos investigadores volvieron al microscopio simple.

Se debe a Dolland, óptico de Londres, el invento del objetivo apocromático (fig. 8), consistente en dos lentes superpuestas, una convergente y otra divergente, el qual corrige las aberraciones, logrando mejorar de tal modo las observaciones, que desde este momento hasta nuestros días el microscopio compuesto no ha cesado de perfeccionarse, gracias a los constructores de Alemania, Inglaterra y Francia, quienes han aportado mejoras y nuevos accesorios: visión binocular, ultramicroscopio, revólver portaobjetivos, microscopio polarizante, etc., hasta llegar al microscopio electrónico actual.

FUNDAMENTOS E HISTORIA

HISTORIA DEL MICROSCOPIO



Fig. 1. — Zacarías Janssen, que en 1590 construyó el primer microscopio compuesto.



Fig. 2. — Antonio van Leeuwenhoek (1632-1723), que, construyendo sus propias lentes, llegó a obtener aumentos de 270 diámetros.



Fig. 3. — Microscopio simple de Leeuwenhoek.

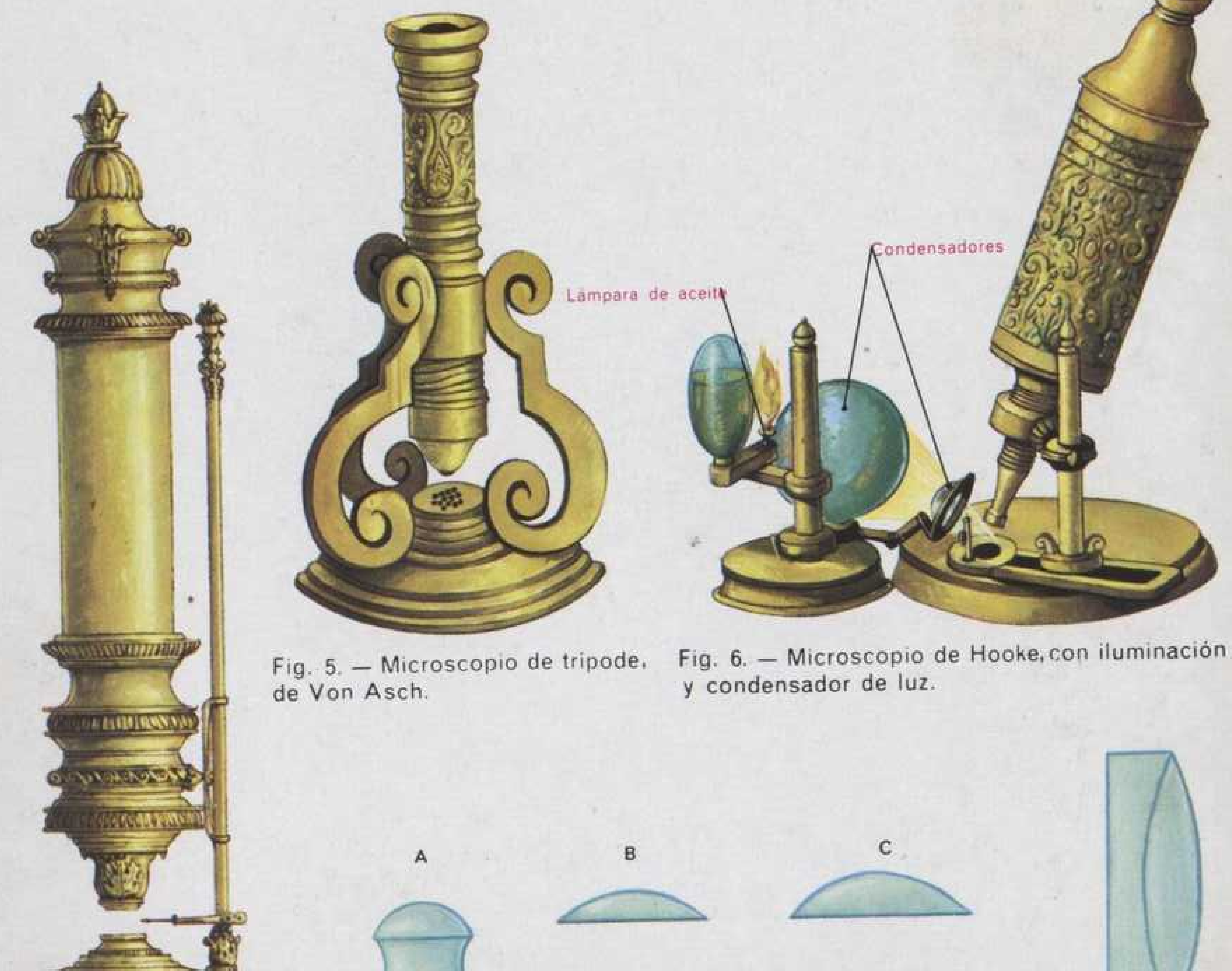


Fig. 5. — Microscopio de trípode, de Von Asch.

Fig. 6. — Microscopio de Hooke, con iluminación y condensador de luz.

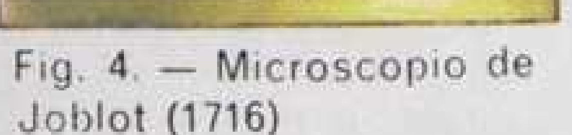


Fig. 4. — Microscopio de Joblot (1716)

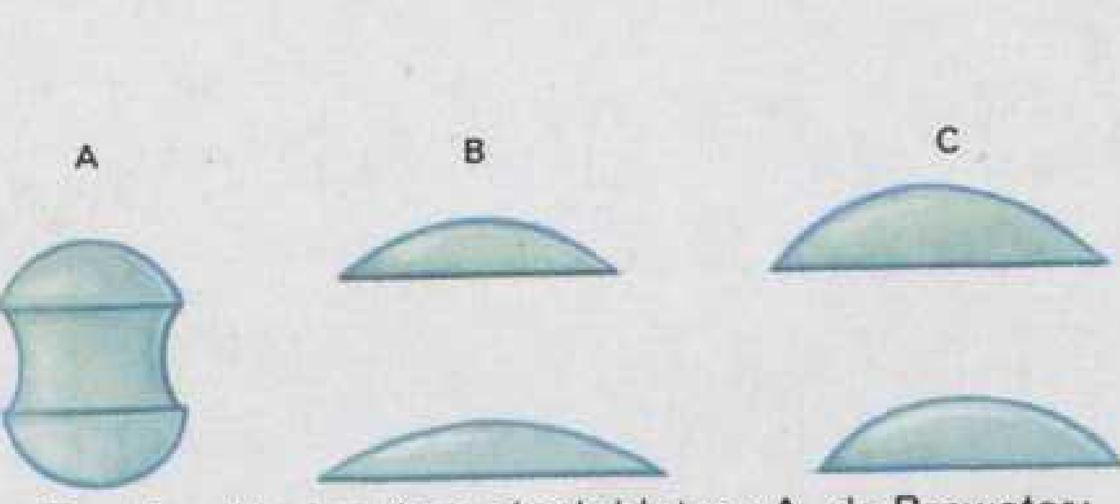


Fig. 7. — Varios tipos de dobletes: A, de Brewster; B, de Chevalier, y C, de Wollastone.

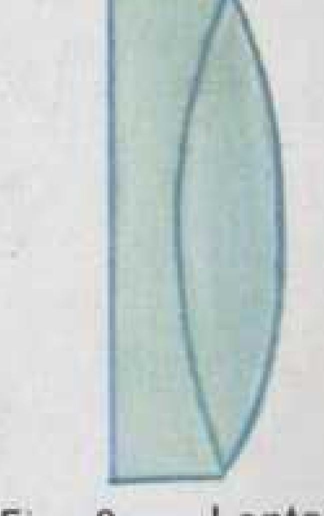


Fig. 8. — Lentes apocromáticos.

TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN

DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO

PARTE MECÁNICA

Está compuesta por el pie, la platina y el tubo.

El pie. Es una pieza maciza y pesada, para asegurar la estabilidad del aparato y servir de soporte a sus demás partes. Suele estar provista de charnela, que permite la inclinación de la parte superior.

La platina. Es una pieza metálica, redonda o cuadrada, donde se colocan las preparaciones; tiene en el centro una abertura circular por la que pasarán los rayos luminosos procedentes del sistema de iluminación. En los microscopios corrientes puede ser fija o estar adosada a un carro con dos tornillos de cremallera que permitan dos movimientos de traslación, para centrarla, y también, si los tornillos están graduados, para medir sus desplazamientos.

La preparación se sujeta, en las platinas fijas, con dos palanquitas móviles, y en las platinas de carro, por un reborde, en forma de escuadra y pestillo, que le impide cualquier movimiento imprevisto. (Fig. 1.)

El pie se prolonga por encima de la platina, en arco más o menos curvo. La parte superior de este arco es la que sostiene el tubo y su mecanismo de traslación vertical. Ésta tiene suma importancia, pues permite enfocar el objetivo mediante dos movimientos: uno rápido, gracias a una cremallera, y otro lento, con un tornillo micrométrico.

El tubo. En él está instalado el sistema óptico. Está constituido por dos tubos o cuerpos. Uno de ellos, externo, en el que se encuentran la cremallera y el ocular, y otro, interno, adosado al anterior, donde está el objetivo. En la parte superior hay una división milimétrica que permite modificar la distancia entre objetivo y ocular. Son corrientes en los aparatos modernos los binoculares, que facilitan la visión con los dos ojos, y los revólveres portaobjetivos, con los cuales se pueden cambiar los objetivos instantáneamente, sin desenfocar la preparación. (Figura 1.)

PARTE ÓPTICA

Objetivos

Son los elementos más importantes del microscopio. Están formados por la reunión de varias lentes para corregir las aberraciones. Deben tratarse con mucho cuidado, pues cualquier golpe puede variar la posición de las lentes y averiarlas. Se atornillan a la parte inferior del tubo o al revólver portaobjetivos.

La lente inferior del objetivo denomínase lente frontal. De ella depende principalmente la mayor o menor ampliación. Es siempre plano-convexa, de foco muy corto y de diámetro tanto menor cuanto mayor sea el aumento.

Detrás de esta lente hay otras, que son las que corrigen las aberraciones cromáticas y esféricas.

Objetivos en seco. Son los que se emplean más corrientemente. Entre la lente frontal y el cubreobjetos sólo hay aire. A este grupo pertenecen los objetivos de menores aumentos. Las lentes frontales tienen de 3 a 10 milímetros de diámetro. Poseen gran profundidad de foco, lo cual permite observar diferentes planos paralelos del objeto. (Fig. 2, A.)

Objetivos de inmersión. Se llama así a aquellos en los cuales, para la observación, debe interponerse entre la lente frontal y la preparación un líquido que, por su índice de refracción apropiado, permita una mayor luminosidad. Este líquido puede ser agua, aceite, monobromuro de naftaleno, etcétera. Son, estos objetivos, de gran aumento y de gran poder definidor. Se emplean en Bacteriología y Parasitología. Requieren gran luminosidad y empleo de condensador. (Fig. 2, B y C.)

Objetivos apocromáticos. Todos los objetivos, secos o de inmersión, están acromatizados sólo para dos rayos del espectro, el rojo y el azul. Son los llamados cromáticos, pero si conseguimos corregir este defecto para tres rayos, se elimina casi completamente el llamado espectro secundario, y tenemos los objetivos apocromáticos.

Cualidades de los objetivos. Los objetivos deben poseer tres cualidades, a saber: poder definidor, poder penetrante y poder resolvente. El primero consiste en la propiedad de presentar con limpieza y corrección los contornos de la imagen. El poder penetrante es la propiedad de presentar, sin variar el enfoque, perfectamente detallados varios planos del espesor de una preparación. El poder resolvente permite apreciar delicados detalles de estructura.

El microscopio se ensaya, para tratar de comprobar sus poderes amplificante, resolutivo, etc., mediante unos «tests» o preparaciones de prueba en que deben observarse sutiles minucias estructurales.

Oculares

Los forman dos lentes separadas por un diafragma, y van montados en la extremidad superior del tubo. La len-

DESCRIPCION DEL MICROSCOPIO

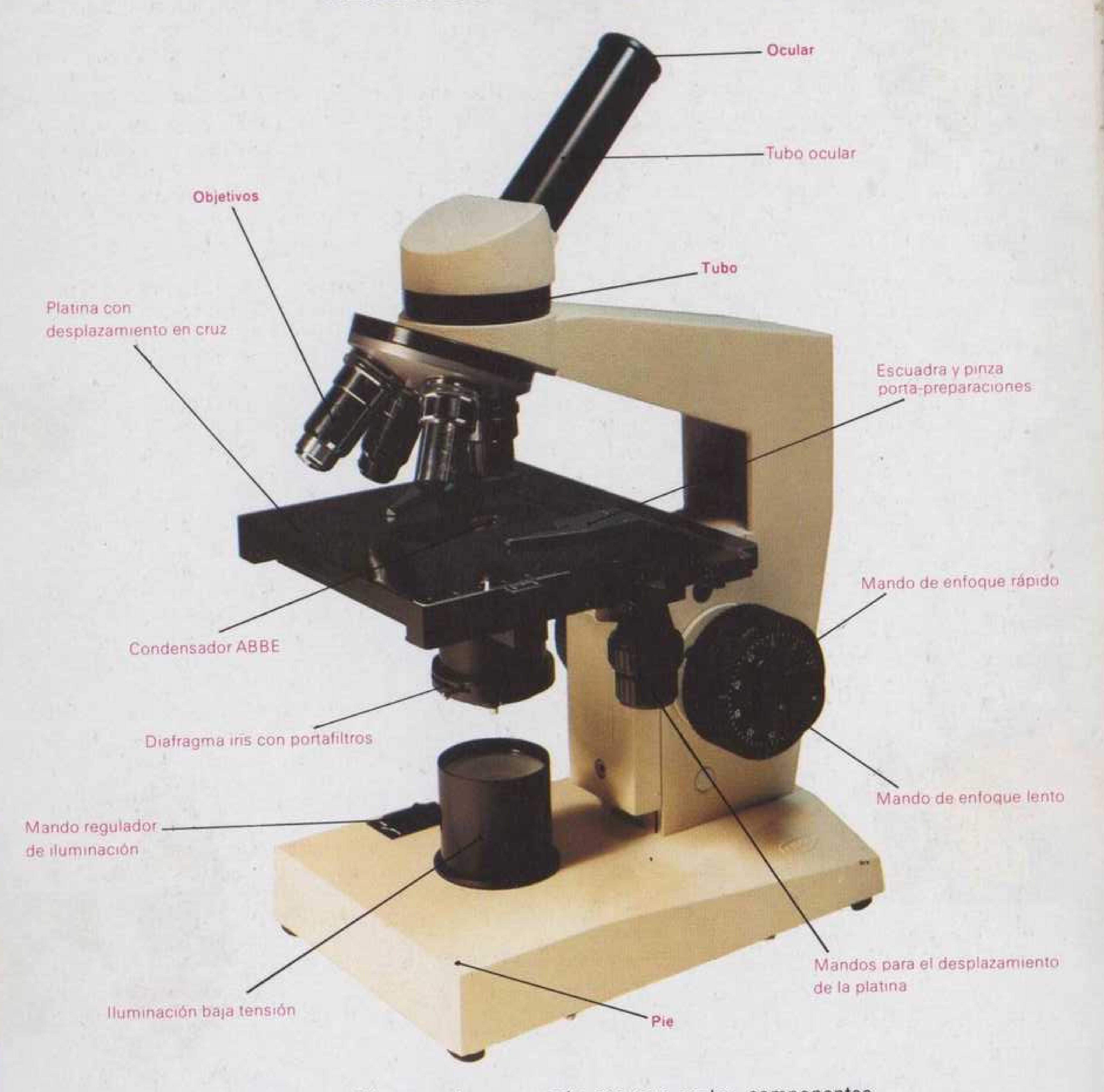


Fig. 1. — Microscopio compuesto, con sus partes componentes.

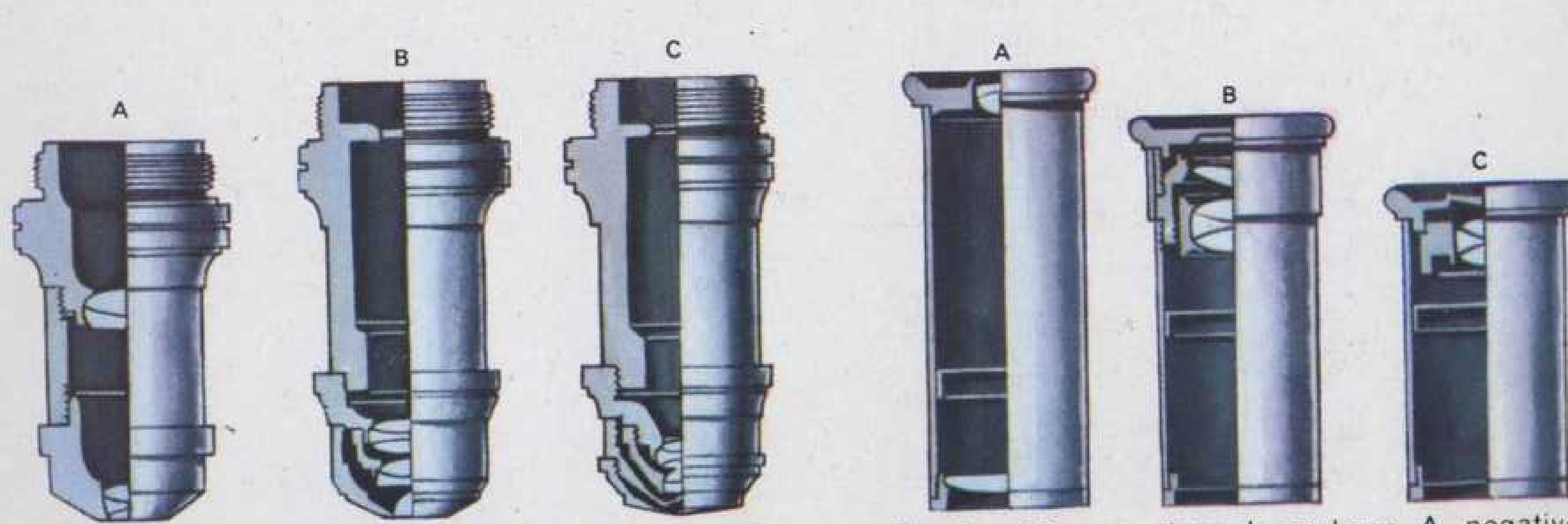


Fig. 2. — Objetivos. A, de observación en seco; B, de inmersión en agua; C, de inmersión en aceite.

Fig. 3. — Diversos tipos de oculares. A, negativo; B y C, positivos.

te superior se llama lente ocular; la inferior, lente de campo. Hay dos tipos de oculares: los positivos, o de Ramsden, que tienen dos lentes plano-convexas, y cuyas convexidades se oponen una a la otra (lám. B/1, fig. 3, B y C), y los negativos, o de Huyghens, que se llaman también de compensación, por tener compensadas las desigualdades de aumento para los diferentes colores del espectro y en los que las curvaturas de las lentes se dirigen al objeto (lám. B/1, fig. 3, A). Tanto el microscopio simple como el compuesto pueden ser binoculares; éstos dan mejor calidad a la imagen y más cómoda visión. El tubo se bifurca, con los correspondientes prismas de reflexión total, y termina en dos oculares iguales.

Sistema de iluminación

Se encuentra situado bajo la platina (fig. 1) y tiene la misión de iluminar los objetos por medio de luz transmitida, a causa de que la mayoría de las observaciones se realizan por transparencia. Consta de un espejo y de un diafragma. El espejo, redondo y adaptable a las más variadas posiciones, tiene una superficie plana y otra cóncava, que pueden intercambiarse a voluntad. El espejo plano, para objetivos de escaso aumento, y el cóncavo, para grandes aumentos. La fuente luminosa puede ser natural o artificial. Esta última es idónea cuando proviene de una lámpara de 50 W. opalina. Algunos microscopios llevan acoplada a su pie una lámpara especial para estos aparatos. (Figs. 5 y 6.)

El diafragma va montado bajo la platina. Es de sistema iris, y permite, por medio de una palanca, obtener a voluntad conos luminosos de distinto tamaño (fig. 3) y, mediante condensadores, conos luminosos muy grandes. Los condensadores (fig. 2) constan de un sistema de lentes de gran abertura sujetos a una montura y colocados entre la platina y el espejo, pueden subirse y bajarse a voluntad y tienen un diafragma unido al conjunto.

CLASES DE MICROSCOPIOS

Además de los microscopios simples y compuestos normales, se construyen otros para observaciones especiales.

Microscopio de contraste de fases

Se debe al holandés Zernicke. Tiene por objeto facilitar el estudio de elementos transparentes y no coloreados.

El contraste de fases se propone hacer variar los contrastes de la imagen, y para lograrlo se utilizan las diferencias de absorción y de marcha de los rayos en el sistema óptico, o sea se varía el valor de la fase en los rayos con que se ilumina.

En la práctica, cualquier microscopio puede equiparse con este dispositivo, que proporcionan las casas constructoras (fig. 4). Se emplea para observaciones en fresco sin teñir, en Citología, Bacteriología y Parasitología.

Microscopio de polarización

En ocasiones, para la observación de sustancias birrefringentes es indispensable el examen con luz polarizada; para ello se adapta al microscopio ordinario, bajo la platina, un nicol polarizador, y sobre el ocular otro, analizador.

Haciendo girar el analizador hasta que el campo aparezca oscuro, se destacarán en éste aquellas sustancias que presenten el fenómeno de la birrefringencia con caracteres especiales de luminosidad o coloración.

Se emplean estos microscopios en Petrografía y Mineralogía. (Fig. 7.)

Ultramicroscopio

Permite observar los objetos sobre fondo oscuro, aprovechando tan sólo aquellos rayos que son reflejados por las partículas u objetos sobre los que recae la observación y desechando, en cambio, los que penetran directamente.

En la práctica, esto se consigue mediante el empleo de condensadores especiales y con una fuerte luminosidad. Los objetos a observar se montan en agua o aceite entre un porta y un cubre de escaso espesor.

A menudo se hacen sinónimos examen sobre fondo oscuro y ultramicroscópico. El primero es habitualmente utilizado en microscopía clínica; el segundo se reserva para exámenes de objetos realmente ultramicroscópicos.

Microscopio electrónico

Tiene el mismo fundamento teórico que el microscopio óptico, pero en él se trabaja, no con rayos luminosos, sino con rayos electrónicos propagados en el vacío, que, concentrados y refractados por campos magnéticos, se proyectan sobre una preparación y se recogen en un foco donde proyectan una imagen no visible, pero que puede fotografiarse o revelarse en una pantalla especial. Con él se alcanzan aumentos de 30.000 a 100.000 diámetros. (Fig. 8.)

MICROSCOPIOS ESPECIALES

En la industria y en la investigación se emplean numerosos microscopios adaptados a una determinada observación, y acerca de ellos hablaremos en otros lugares de esta obra.

TECNICAS DE OBSERVACION

DESCRIPCION DEL MICROSCOPIO

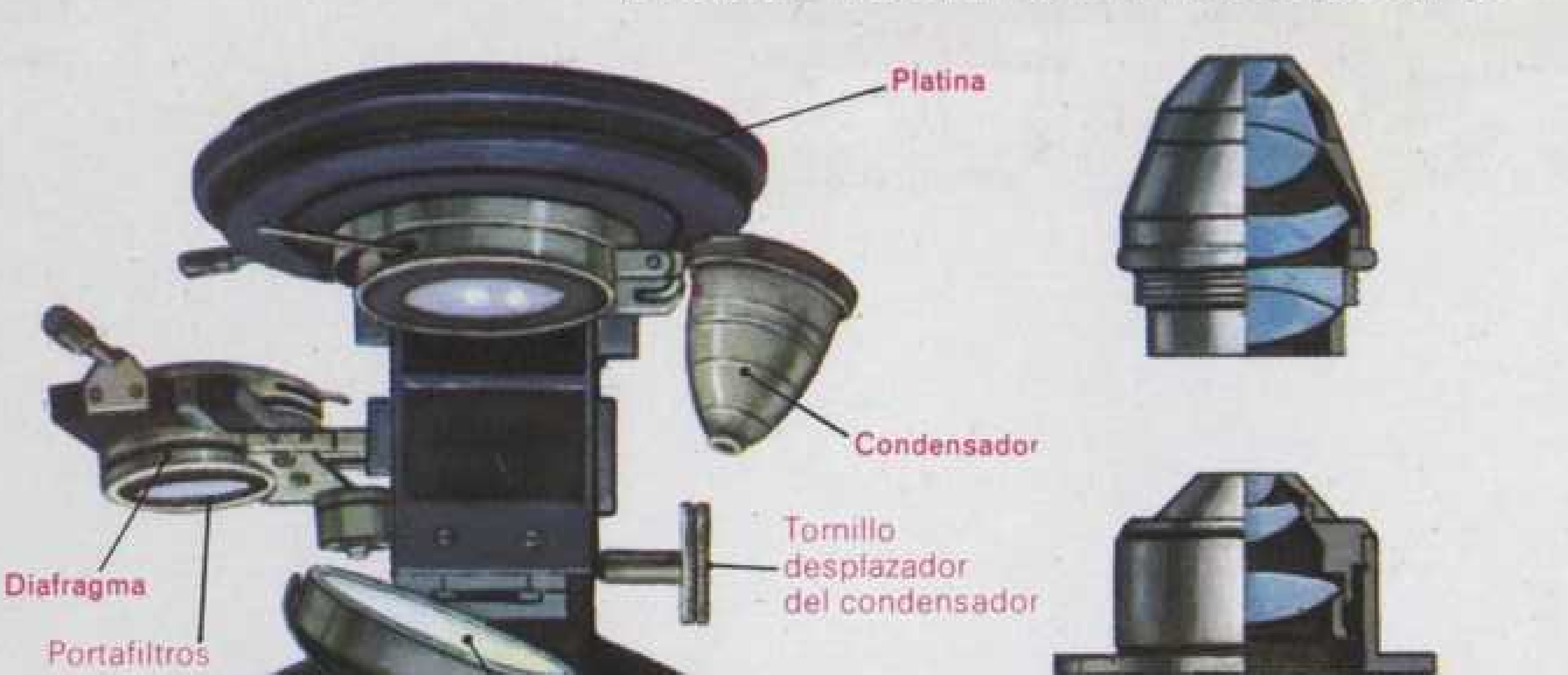


Fig. 1. — Sistema de iluminación.

Fig. 2. — Condensadores.

Fig. 3.– Diafragma tipo iris.



Fig. 4. — Equipo de contraste de fase.



Fig. 5. — Lámpara acoplable al microscopio.

Fig. 6.– Lámpara puntiforme para microscopio.



Fig. 7. — Microscopio de polarización.





Fig. 8. — Microscopio electrónico.

REGLAS GENERALES DE OBSERVACIÓN

Iluminación. Puede utilizarse luz natural o artificial eléctrica. En general, basta cualquier lámpara potente, de filamento y esmerilada. Si no se dispone de lámpara esmerilada, se intercalará en el sitio correspondiente un vidrio deslustrado o azul, o un sencillo matraz lleno de agua con sulfato de cobre y unas gotas de amoníaco, que filtre los rayos amarillos. Si se utiliza luz natural, no debe ser nunca la directa del sol, sino luz difusa: una excesiva iluminación en la mesa de trabajo perturba la observación. (Figuras 1 y 2.)

Enfoque. Es regla general enfocar la preparación de abajo arriba: se aproxima el objetivo a la preparación de modo que la distancia entre ambos sea menor que la distancia focal. Se mira por el ocular y se hace retroceder el tubo lentamente mediante el tornillo rápido, hasta conseguir ver la preparación más o menos enfocada. Seguidamente, lógrase el enfoque exacto con el tornillo micrométrico.

Es conveniente efectuar la observación monocular con los dos ojos abiertos, pero mirando sólo con uno. Es fácil de conseguir cuanto menos iluminada esté la mesa.

El objetivo de inmersión requiere más cuidado: depositada ya la gota de líquido sobre la preparación, bájese el objetivo hasta que la toque. Para enfocar se utiliza el tornillo micrométrico, pero sin perder contacto con la gota y sin tocar la preparación.

Limpieza. Una vez terminada la observación debe limpiarse el objetivo con un paño de hilo usado, pero limpio, empapado de xilol o de tolueno. Se guarda el aparato en una caja de madera o se tapa con una campana de cristal o de plástico. (Fig 3.)

MEDICIÓN DE OBJETOS MICROSCÓPICOS

El procedimiento más sencillo es el del ocular micrométrico. Es éste un ocular corriente que, en el sitio correspondiente al diafragma, lleva un retículo graduado cuyas divisiones abarcan 0,10 mm. (Fig. 5.) Para cada objetivo hay que establecer el valor en micras de una división de la escala, utilizando un micrómetro objetivo. Éste consiste en una escala grabada en un vidrio semejante a un portaobjetos, que comprende 100 divisiones de 0,01 mm. (Fig. 4.) Colocando el micrómetro objetivo sobre la platina del microscopio, y enfocando con el objetivo con el cual tratamos de medir, se busca, superponiendo las imágenes de ambas graduaciones, cuántas divisiones del micrómetro objetivo son cubiertas exactamente por una o varias del micrómetro ocular. Establecido este dato, se determina la fórmula o coeficiente micrométrico. Así; de cubrir la división 10 del ocular cuatro trazos del objetivo, 10 divisiones oculares representarán 10 veces 0,01 mm., y una división ocular representará

$$\frac{0{,}04 \text{ mm.}}{10} = 0{,}004 \text{ mm.} = 4 \text{ micras.}$$

Cada división del micrómetro ocular vale, por tanto, cuatro micras para la combinación óptica con que trabajamos. No queda sino colocar la preparación que se ha de medir, en lugar del micrómetro objetivo, observar a cuantas divisiones oculares corresponde y multiplicar por 4. El valor total nos será dado en micras.

Otro procedimiento consiste en emplear el ocular micrométrico sin ayuda del micrómetro objetivo. Si no conocemos el aumento de la combinación óptica con la que estamos trabajando, lo obtendremos sabiendo los aumentos propios de ocular y objetivo; multiplicando ambos, nos darán el aumento total. Podemos, pues, calcular fácilmente el tamaño de un objeto superponiendo su imagen a la escala ocular y dividiendo el número de divisiones que abarca por la cifra de aumento del microscopio. La cifra resultante es, en milímetros, el tamaño real del objeto.

DIBUJO DE OBJETOS MICROSCÓPICOS

Cámara clara. Cuando interese conservar el dibujo de la preparación, éste puede hacerse de memoria, alternando las observaciones visuales con la ejecución a lápiz del dibujo o empleando la cámara clara. Ésta es un pequeño aparato que se coloca sobre el ocular del microscopio, el cual, por medio de unos prismas y espejos, refleja la luz y presenta, a la vez, a la observación, las imágenes superpuestas de la preparación y el papel situado encima de la mesa de trabajo.

Las cámaras claras más corrientes son las de Abbe, Nachet y Malassez. Iluminación del papel y de la preparación deben tener la misma intensidad, y el papel, estar a unos 25 cm. del ojo del observador.

Es utilizable también, para dibujar preparaciones, el ocular de proyección.

TECNICAS DE OBSERVACION

REGLAS GENERALES DE OBSERVACION

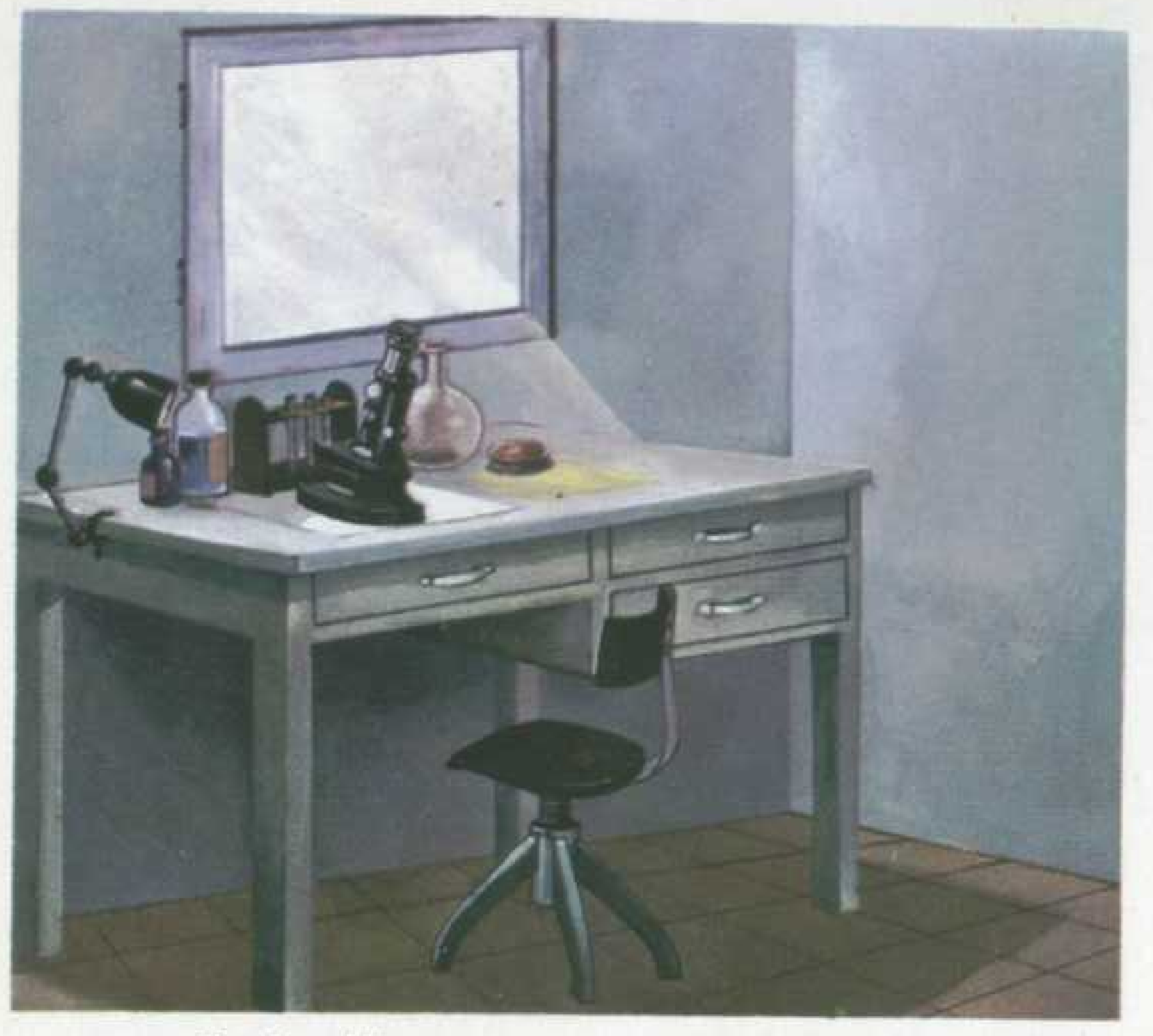
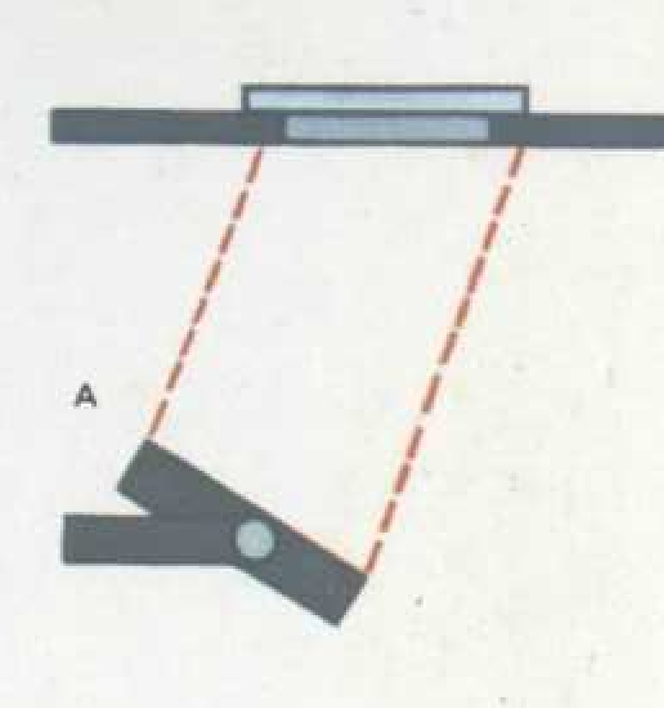


Fig. 1. — Microscopio en la mesa de trabajo.



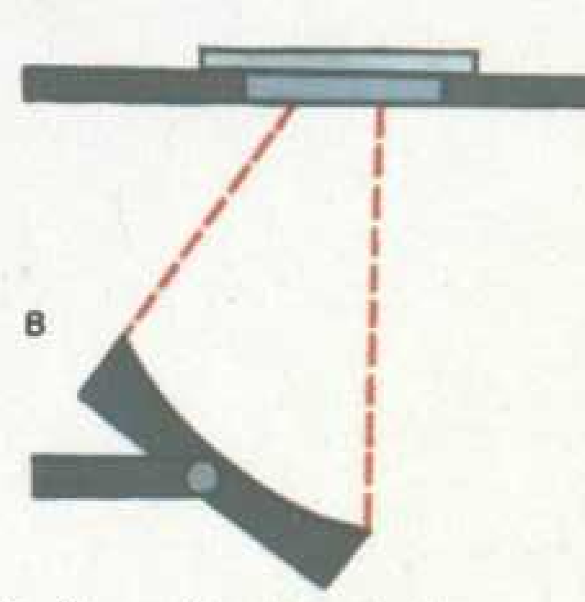


Fig. 2. — Marcha de los rayos de luz al ser reflejados por un espejo. En A, espejo plano; en B, cóncavo.



Fig. 3. — Campana de cristal para la protección del microscopio.

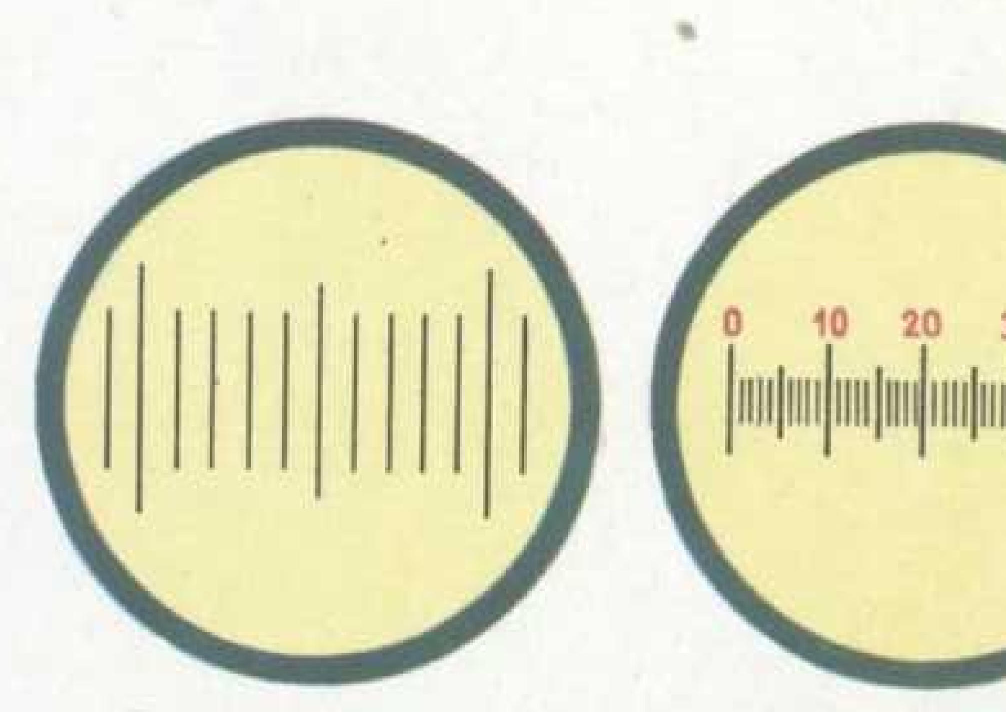
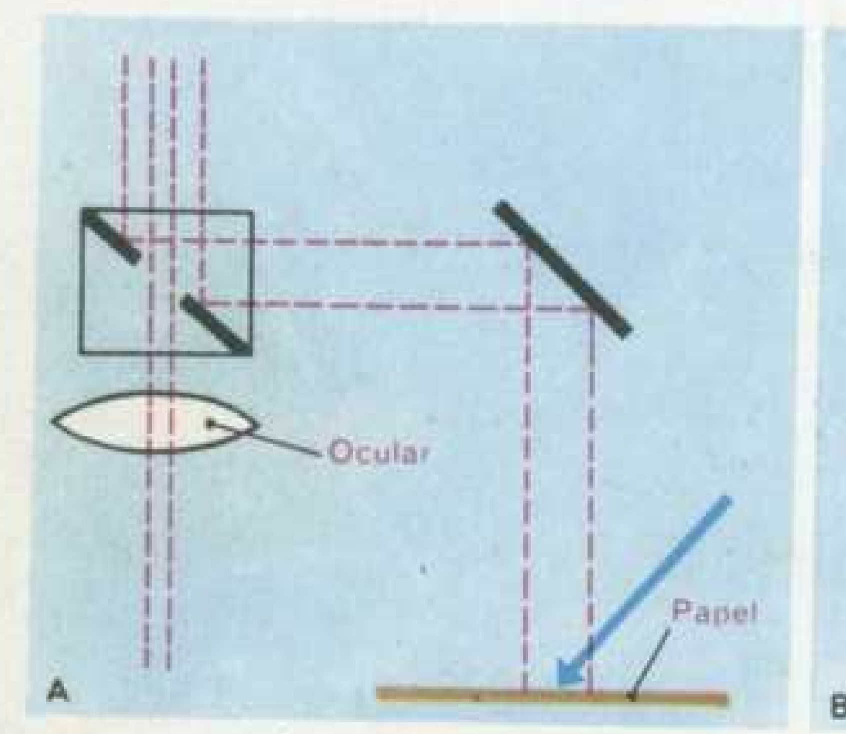
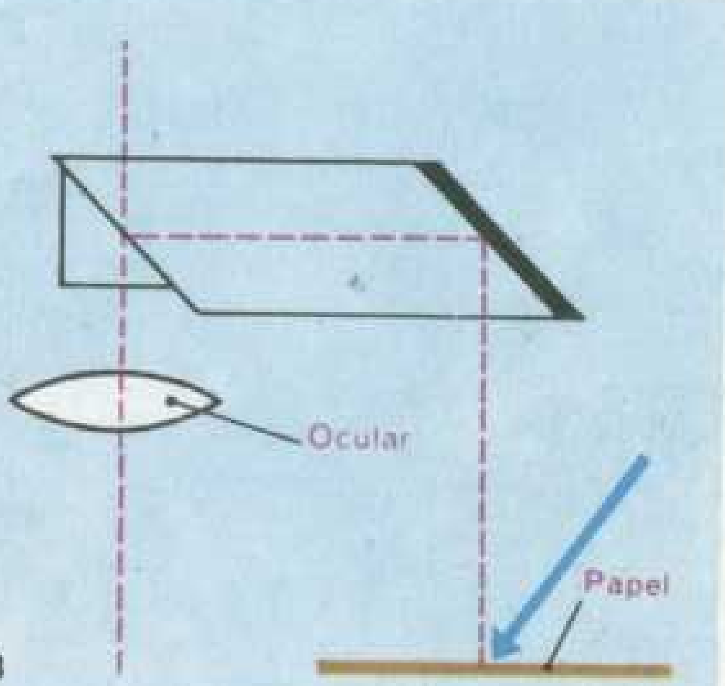


Fig. 4. — Micrómetros; A, objetivo; B, ocular.





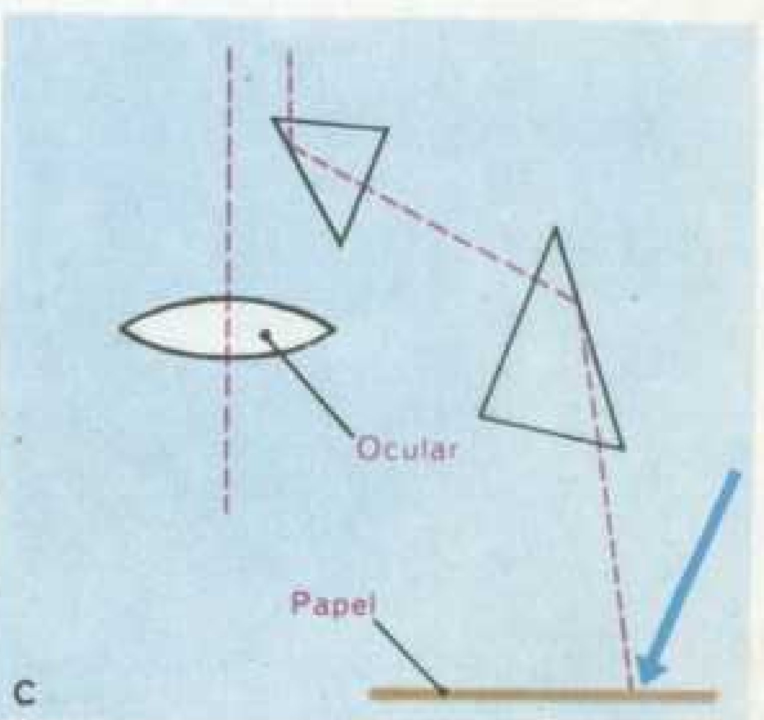


Fig. 5. — Marcha de los rayos luminosos en las cámaras claras de Abbé (A), de Nachet (B) y de Malassez (C

TÉCNICA DE LAS PREPARACIONES

En general, una preparación microscópica es el resultado de una serie de operaciones destinadas a disponer el material de observación en una capa de poco espesor, lo más pequeña y representativa posible, en seco, en líquido, en vivo o en partes, encima de una plaquita de vidrio transparente *(portaobjetos* o *porta)* y tapada, algunas veces, con otra mucho menor y más delgada *(cubreobjetos* o *cubre)*.

Portaobjetos. Deben ser de vidrio lo más transparente posible, de un espesor aproximado de dos milímetros y de unas medidas «standard»: 76 × 26 milímetros; los bordes pueden ser o no esmerilados. (Fig. 1, A.) Algunos tienen una concavidad circular en su centro, destinada a recibir gotas de líquido con elementos para su estudio (gota pendiente). (Fig. 1, B.)

Cubreobjetos. Los hay de muchos tamaños: los habituales son 18 × 18, 20 × 20 y 22 × 32, y de diversas formas: los más son cuadrangulares. (Figura 1, C.) Su espesor es aproximadamente de 0,25 milímetros.

Tanto los portas como los cubres deben limpiarse antes de emplearlos con alcohol para eliminar la grasa y el polvo. Después de utilizados y limpios, conviene dejarlos en un frasco de boca ancha con alcohol. (Fig. 2.)

Es muy conveniente emplear los cubres para dar mayor uniformidad a las preparaciones. Solamente se prescindirá de ellos en las observaciones secas con objetivo de inmersión.

Otros accesorios para la confección de preparaciones vense en fig. 4.

1.ª Preparaciones opacas. Pueden cubrirse o no, según el espesor del objeto. Como raramente se pueden iluminar por transparencia, se emplea luz lateral o central, iluminando la preparación por encima con una lámpara y un condensador, o con lámpara y lupa para concentrar los rayos.

2.ª Preparaciones transparentes delgadas. La luz axial blanca, el condensador levantado y el iris con 3/4 de abertura permiten el examen de preparaciones delgadas de objetos coloreados: hongos, bacterias, organismos del plancton, etc. La interposición de un filtro, de color complementario del objeto que se observa, da una imagen más fina y detallada. Se emplean objetivos fuertes y de inmersión.

3.ª Preparaciones transparentes espesas. *a)* Se baja el condensador y se disminuye la abertura del iris tanto como sea posible. La luz axial reducida disminuye la abertura y aumenta la profundidad. Con un objetivo de mediano aumento y un ocular fuerte puede observarse la preparación en su base y en sus diferentes planos. *b)* Se sube el condensador y se abre todo lo posible el diafragma. Se utiliza un objetivo fuerte y un ocular débil. Y se estudia la preparación en sus diferentes planos, separadamente.

PREPARACIONES ENTRE PORTA Y CUBRE

Para observar organismos acuáticos microscópicos (algas, cortes transparentes, gusanos, larvas, etc.), basta poner encima del porta una gota del líquido que los contenga. Se coge el cubre con dos dedos, se pone en contacto uno de sus bordes con la gota y se deja caer por su propio peso, para que el aire no forme burbujas. Se observa con poca luz y objetivo débil. (Fig. 3.)

GOTA PENDIENTE

Es un método parecido al anterior, con la diferencia de que en él se emplean portas excavados (fig. 5). Se pone en el centro del cubre una gotita del líquido que se va a observar. Se invierte el cubre y se coloca encima del porta de modo que la gota no toque el fondo de la excavación. Antes, se humedecen los bordes con vaselina, evitando así la evaporación.

LIQUIDOS PARA EL EXAMEN EN FRESCO

Diluentes del material a examinar.

a) Líquidos fisiológicos. Para conservar los organismos vivos en las condiciones más parecidas a las naturales.

Solución fisiológica:

Cloruro sódico . . .	9	gr.
Agua destilada . . .	1.000	ml.

Y la solución *Ringer.*

b) Líquidos de adición. Aclaran los objetos poco transparentes que precisan un tratamiento que los haga visibles; por ejemplo, pequeños insectos, pelos, fragmentos vegetales, etc.

Lactofenol:

Acido fénico cristalizado .	1 gr.
Acido láctico	1 »
Glicerina	2 »
Agua destilada	1 ml.

Basta sumergir en una gota de lactofenol el objeto, colocado en un porta y tapado después con el cubre. Se puede acelerar el aclarado calentando todo ligeramente a la llama de alcohol.

De mayor poder aclarante es el

Clorofenol:

Hidrato de cloral cristalizado	2 partes
Acido fénico cristalizado.	1 »

Atlas de MICROSCOPIA

POR F. J. BERNIS MATEU, LICENCIADO EN FARMACIA

TECNICAS DE OBSERVACION

TECNICA DE LAS PREPARACIONES



Fig. 1 – A, portaobjetos normal, B, portaobjetos excavado, y, C, cubreobjetos

Fig 2. — Frasco de boca ancha para guardar los portaobjetos.



Fig. 3. — Forma correcta de colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos normal.



Fig. 4. — Instrumental y recipientes utilizados en las preparaciones.

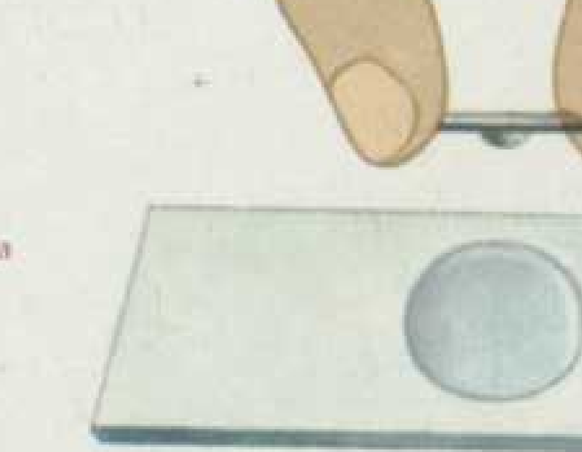


Fig. 5. — Manera de colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos excavado.

DISOCIACIÓN

La disociación consiste en dividir en pedazos tan pequeños como sea posible, con ayuda de agujas y lancetas, un fragmento de órgano o de tejido colocado en una pequeña porción de líquido (agua, líquidos fisiológicos o aclarantes). Se sujeta el fragmento valiéndose de la mano izquierda con ayuda de una aguja, mientras con la derecha, mediante una lanceta (fig. 1) se van separando los fragmentos, teniendo en cuenta su estructura.

CORTES

Se emplean para lograr porciones de tejidos u órganos en fragmentos lo suficientemente delgados que comprendan un número reducido de células y puedan ser observados por transparencia. Corrientemente se hacen varios cortes de una misma porción y, si es posible, en dos secciones perpendiculares. Pueden conseguirse mediante una hoja de afeitar afilada, con bisturíes o, cosa más corriente, con aparatos especiales llamados micrótomos.

Para la observación de minerales, también se emplean cortes o láminas finas, logradas con aparatos especiales.

Antes de efectuar los cortes, deben prepararse los materiales recurriendo a operaciones tendentes a endurecerlos. El endurecimiento puede lograrse con sustancias químicas, como el alcohol, el formol, el ácido crómico

Indudablemente lo que mejores resultados proporciona es la inclusión. Consiste ésta en hacer penetrar íntimamente en los objetos, previamente fijados, una masa plástica que dé al material la dureza deseada para poderlo cortar sin dificultad. Existen varias materias para ello. Las más usadas son la médula de saúco, el corcho, la parafina y el colodión. (Fig. 2.)

Inclusión en parafina

Su técnica, a grandes rasgos, incluye:

1.º Fijar en líquido de Bouin o formol durante tres días.
2.º Lavar con alcohol de 90º.
3.º Deshidratar durante 24 horas por pases sucesivos en alcoholes de diferentes graduaciones, finalizando en el alcohol absoluto.
4.º Introducir en una mezcla de alcohol butílico, tolueno o xilol y parafina durante varias horas.
5.º Introducir y dejar durante 24 horas en parafina fundida.

Inclusión en colodión

Aconsejable cuando en el material existen muchas cavidades que, si se llenan de colodión, no perturban, gracias a su transparencia, la observación.

1.º Se fija y deshidrata al mismo tiempo el material, tratándolo durante 12 horas en una mezcla de alcohol absoluto y éter.
2.º Se baña el material en soluciones, cada vez más concentradas, de colodión en éter y alcohol. Estos baños pueden prolongarse varios días, según el grueso del objeto. Generalmente, con tres días basta. En vez de colodión puede utilizarse celoidina.

Preparado el objeto, podemos obtener los cortes, incluso a mano, con una hoja de afeitar bien afilada, sujetando el material con la izquierda y atacándolo oblicuamente con la derecha armada de la hoja. Se corta lo más finamente posible. Con cierta práctica es fácil de conseguir.

MICRÓTOMOS

El micrótomo de mano es un aparato muy sencillo. Consiste en un tubo en cuyo interior se coloca la inclusión. En la parte superior, una platina sostiene la hoja, que es corredera. Con un tornillo milimétrico, situado en la parte inferior, se hace subir la inclusión y se gradúa el espesor a que deseemos cortar. (Fig. 3.)

Esencialmente, los micrótomos constan de platina, hoja y tornillo. En el mercado hay varios modelos, como el de Minot (fig. 4).

Se emplean los cortes por congelación cuando el material debe ser examinado con rapidez. El sistema refrigerador es habitualmente el anhídrico carbónico por descompresión rápida.

Una vez obtenidos los cortes, si no fueron incluidos, pueden colocarse directamente en un porta con un líquido a elección —agua, suero, glicerina, etcétera—, taparse con un cubre y observarse. Previamente pueden haber sido coloreados, como veremos más adelante. Los incluidos en parafina se colocan en un porta con una gota de agua albuminosa y, sin dar lugar a que se funda la parafina, se calientan ligeramente, a fin de que queden pegados al porta. Se recoge el agua sobrante con un papel de filtro y se disuelve la parafina con toluol. Se tapan o montan y pueden observarse.

FIJACIÓN

La mayoría de las preparaciones, especialmente las bacteriológicas, histológicas y parasitológicas, antes de ser observadas deben ser fijadas, para que no sufran alteraciones en las operaciones siguientes (coloreado, montaje).

TECNICA DE LAS PREPARACIONES

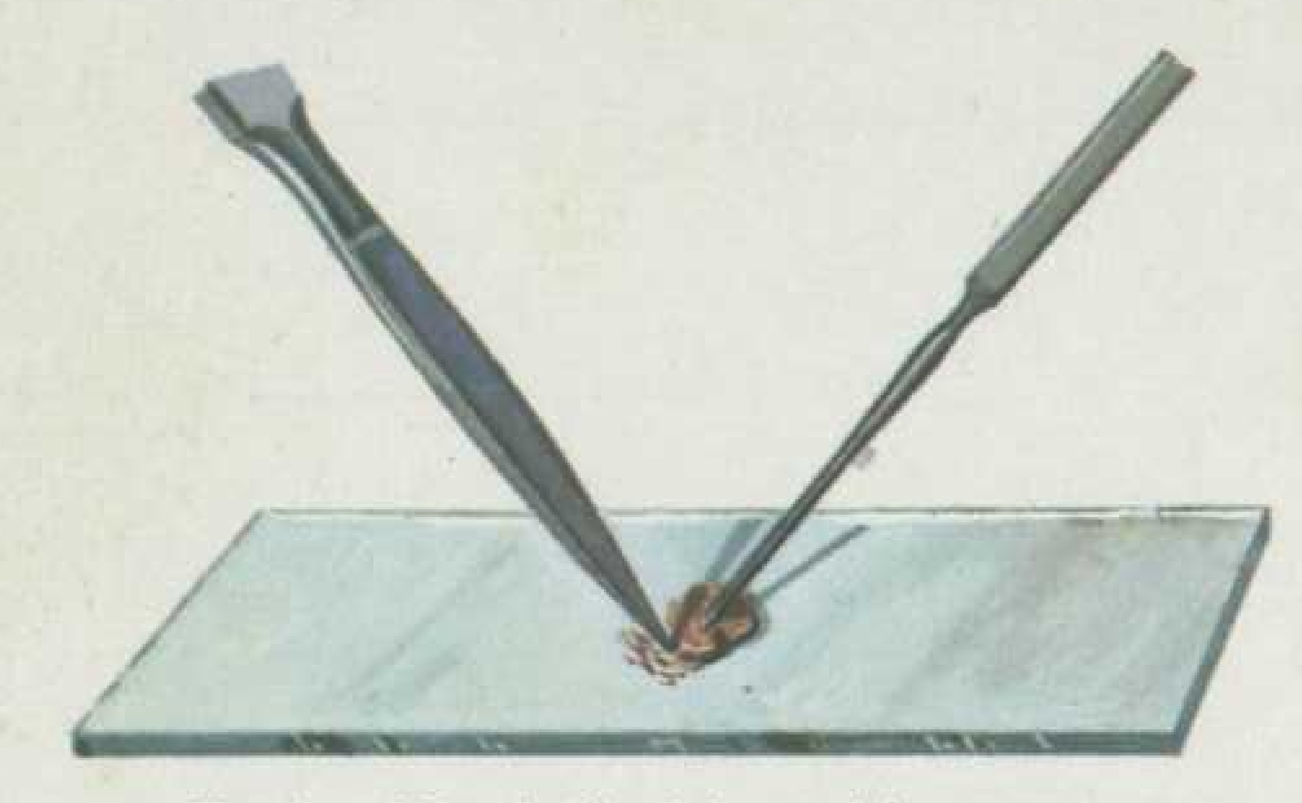


Fig. 1. — Disociación del material a preparar.



Fig. 2. — Inclusión de la muestra en diversos materiales para facilitar los cortes microtomicos.



Fig. 3.– Micrótomo de mano (de Ranvier).

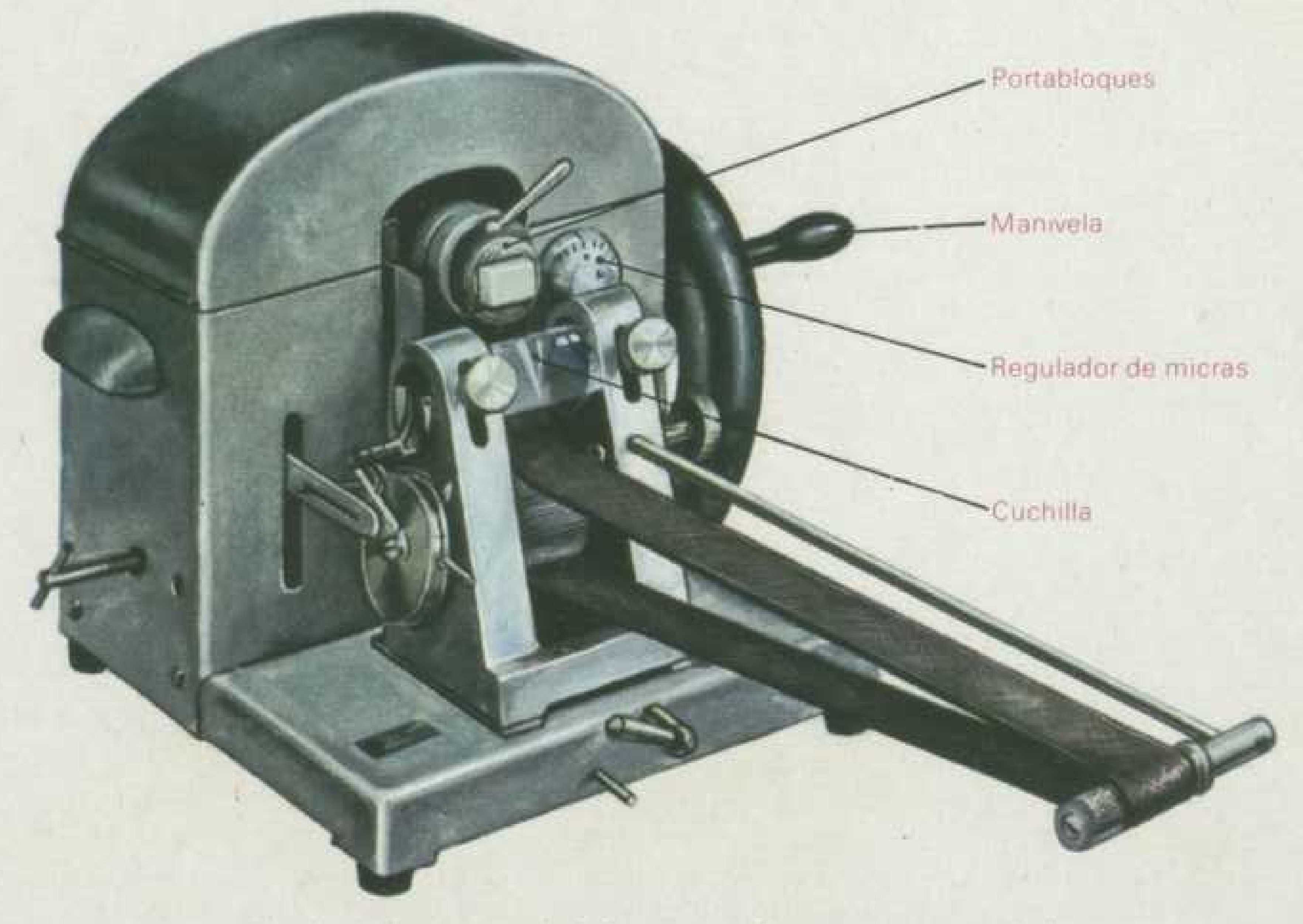


Fig. 4.– Micrótomo de Minot para obtener cortes seriados.

Con manipulaciones adecuadas y líquidos especiales, se logra el efecto deseado, aunque no con la perfección que quisiéramos. Se emplean fijadores físicos: calor, frío, desecación, y fijadores químicos: alcohol, éter, ácido pícrico, formol, mezclas, etc. Nos dará muy buenos resultados el formol, ya que, además de fijar, conserva los materiales, o el líquido de Bouin.

Líquido de Bouin:

Formol	1 parte
Agua	3 partes
Acido pícrico . .	a saturación

En el momento de emplearlo se añade un 5 por 100 de ácido acético cristalizable. Tanto en Botánica como en Zoología, fija los organismos en muy poco tiempo.

Para fijar al calor, una vez extendido en el porta, el material que se va a observar se calienta a la llama hasta secarlo, procurando que el calor no resulte muy intenso. Debe comprobarse con el dorso de la mano el calor del porta, que no ha de dar la sensación de quemadura.

Para fijar al alcohol se ponen, por medio de una pipeta, unas gotas encima de la preparación, cubriéndola totalmente. Las dejamos que actúen unos minutos y desechamos el sobrante inclinándola. Hay un método intermedio: cubrir la preparación con alcohol, dejarlo actuar y después de desechar el sobrante, flamear el resto; se apaga la llama rápidamente, soplando con una pera de goma.

COLORACIONES

Los métodos de coloración están destinados a poner de manifiesto los diferentes constituyentes de las células y de los tejidos que no serían observables, o lo serían deficientemente, sin esta operación. En la mayoría de los casos no se colorea el material uniformemente, sino que se selecciona o da preferencia a una determinada estructura de los elementos celulares.

Unos colorantes se fijan en los núcleos y otros en los citoplasmas, y así se logra, según el uso que de ellos se haga, teñir uno solo o ambos constituyentes a la vez. También pueden conseguirse coloraciones combinadas, dobles o triples, que den preparaciones con los constituyentes celulares teñidos con uno o dos colores a la vez.

Las soluciones colorantes serán elaboradas con sustancias tan puras como sea posible y mezcladas exactamente al título indicado. Una vez preparadas, se conservarán en frascos cuentagotas de color topacio. (Fig. 1.)

El procedimiento más cómodo y limpio para teñir preparaciones es colocar sobre un cristalizador dos varillas de vidrio paralelas, sujetas en sus extremos como indica la figura 3, que constituyen el puente sobre el cual se depositan las preparaciones que se han de teñir. Sobre ellas se pone el colorante, que se deja actuar el tiempo necesario. Es conveniente hacer varias preparaciones para colorearlas con diversos colorantes o todas con el mismo, por si alguna de ellas se inutilizase y se tuviera que empezar de nuevo.

Para lavarlas no es preciso tocar las preparaciones, sino arrastrar el colorante sobrante mediante un chorro de agua. Si no se indica otra cosa, puede emplearse agua del grifo. Lo corriente es tener un frasco lavador en la mesa de trabajo. (Fig. 2.)

Coloraciones vitales

Pueden considerarse como un procedimiento intermedio entre el examen en fresco y la tinción después de fijación. Tienen por objeto poner de relieve detalles estructurales sin causar la muerte al organismo sometido a observación. Se emplean colorantes de escasa toxicidad en diluciones elevadas. Por ejemplo:

Azul de metileno en solución acuosa al 1/500, 1/1.000, ó 1/10.000.

Verde Janus en solución fisiológica al 1/500.

También se pueden emplear colorantes indicadores: rojo neutro, rojo Congo, Orange I, III y IV, etc., que permiten determinar las reacciones de ciertos elementos.

Técnica. Se pone sobre la preparación en fresco, entre porta y cubre, y en la parte media del borde de éste, una gota de colorante, que, por capilaridad, penetrará entre las dos láminas de vidrio y teñirá la preparación. (Figura 4.)

Para conseguir una tinción más uniforme, la técnica más utilizada es colocar sobre el porta una gota del material que se va a examinar y al lado otra de colorante y mezclarlas completamente con el asa de platino o con el borde del cubreobjetos, colocando éste encima una vez coloreado. (Fig. 5.)



TECNICA DE LAS PREPARACIONES

Tapón cuentagotas de cristal

Cuentagotas adosado al tapón

A B

Fig. 1. — Botellas de colorantes. En A, con safranina al 0,2 %; en B, con azul de metileno al 0,5 %.

Fig. 2. — Frasco lavador.

Horquilla de apoyo

Fig. 3. — Modo de colocar las preparaciones sobre el cristalizador.

Tapón de caucho

Asa de platino

Muestra

Gota de colorante

Fig. 4. — Tinción de la preparación por difusión del colorante entre el porta- y el cubreobjetos.

Fig. 5. — Tinción por mezcla del colorante con la preparación, mediante el asa de platino.

Coloraciones simples

Sólo dan una orientación acerca de la morfología y la cantidad. Se emplean la tionina, el azul de metileno, la fucsina fenicada, etc.

Técnica. Se extiende sobre el porta, lo más finamente posible, el material que se ha de examinar, el cual se fija ya al calor, ya al alcohol, etc. Se deposita encima de las varillas, en el cristalizador. Se baña con el colorante el tiempo necesario. Se lava al chorro con agua y se deja secar a calor suave. Se pone encima una gota de aceite de cedro y se observa con objetivo de inmersión. (Fig. 1.)

Los tiempos de coloración son muy variables. He aquí una pauta a seguir:

Fucsina diluida	1	minuto
Violeta genciana	1/2	»
Azul de metilo fenicado	1	»
Azul de metilo alcalino	2	»

Tinción negativa

Este procedimiento de examen de bacterias y protozoos da buenos resultados por destacar sobre fondo oscuro detalles (cilios, flagelados) que no se pondrían de manifiesto por los métodos corrientes. Da imágenes muy semejantes a las que se obtienen con el ultramicroscopio. (Fig. 2.)

Puede hacerse en fresco, al igual que la tinción en vivo, o bien en extensión seca y fijada, como en la coloración simple. Se emplea como colorante tinta especial (R.A.L. — Pelikan, 541). La observación es por inmersión.

Hay quien emplea, en lugar de tinta, rojo Congo al 2 por 100, colargol o nigrosina.

Coloraciones diferenciales

Tienen por objeto realizar la tinción de determinados elementos por contraste con otros o por contraste con el fondo. Existen infinidad de ellas y se emplean en Bacteriología, Protozoología, Histología, etc. En cada caso, citaremos más adelante el método y la técnica apropiados.

Colorantes básicos

También llamados colorantes del núcleo. Son muy abundantes. Citaremos los más corrientes.

Hematoxilina - hemateína

La hematoxilina es un colorante muy corriente (fig. 4), utilizable después de cualquier fijador. Por oxidación se transforma en hemateína, que es el principio activo. Solas, ni la hematoxilina ni la hemateína dan coloración. Asociadas a una base (laca), producen la coloración por mordiente. Son solubles en alcohol y glicerina.

Existen muchas técnicas de coloración con la hematoxilina.

Hemalum de Mayer

Hemateína	1 gr.
Alcohol de 90º	50 ml.
Alumbre al 5 % en agua	1.000 ml.

En lugar de la hemateína puede usarse la hematoxilina, añadiendo a la fórmula anterior 0,2 gramos de yodato potásico, que transforma la hematoxilina en hemateína.

Hematoxilina férrica de Heidenhain

Procedimiento muy empleado en Citología y Parasitología. Los elementos a teñir se introducen en:

a)

Agua destilada	100 ml.
Alumbre de hierro	3 gr.

Después se lavan y se sumergen en otra solución, a la cual se habrá añadido antes doble cantidad de agua:

b)

Agua destilada	90 ml.
Alcohol absoluto	10 »
Hematoxilina	1 »

Se deja actuar durante 24 horas.

Los núcleos y centrosomas se colorean de negro, y el protoplasma, en gris claro.

Fucsina básica

Se mezclan en un mortero, y en la proporción que se indica:

Fucsina	1 gr.
Ácido fénico cristalizado	5 »
Alcohol de 95º	10 ml.
Agua destilada	90 »

Una vez reposado todo, se deja 24 horas y se filtra.

Es un colorante muy rápido y comúnmente usado en Bacteriología.

Violeta de genciana

Se emplea, en soluciones hidroalcohólicas, fénicas o formoladas, en Bacteriología. (Fig. 3.) Una fórmula corriente es ésta:

Solución alcohólica saturada de violeta de genciana	25 ml.
Solución de formol al 5 %	75 »

(Concluye en la lámina D/5)

TECNICAS DE OBSERVACION

TECNICA DE LAS PREPARACIONES

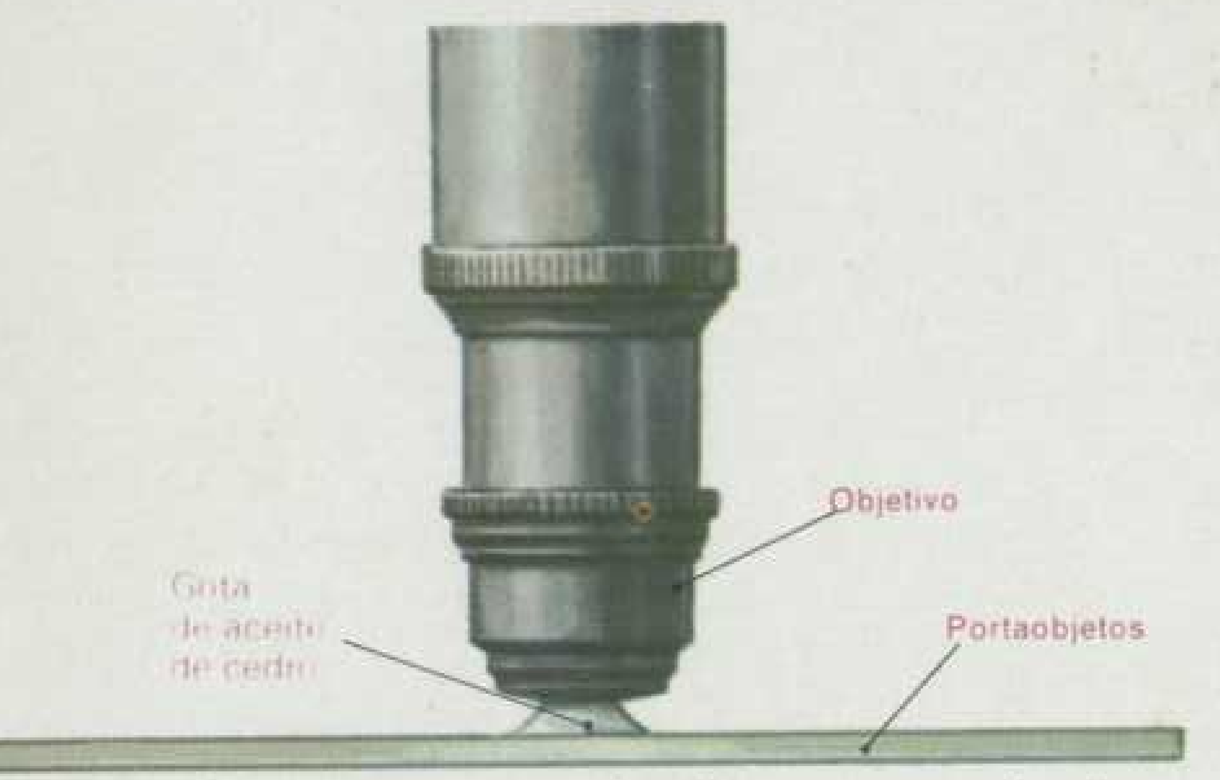


Fig. 1. — Objetivo de inmersión dispuesto para la observación.

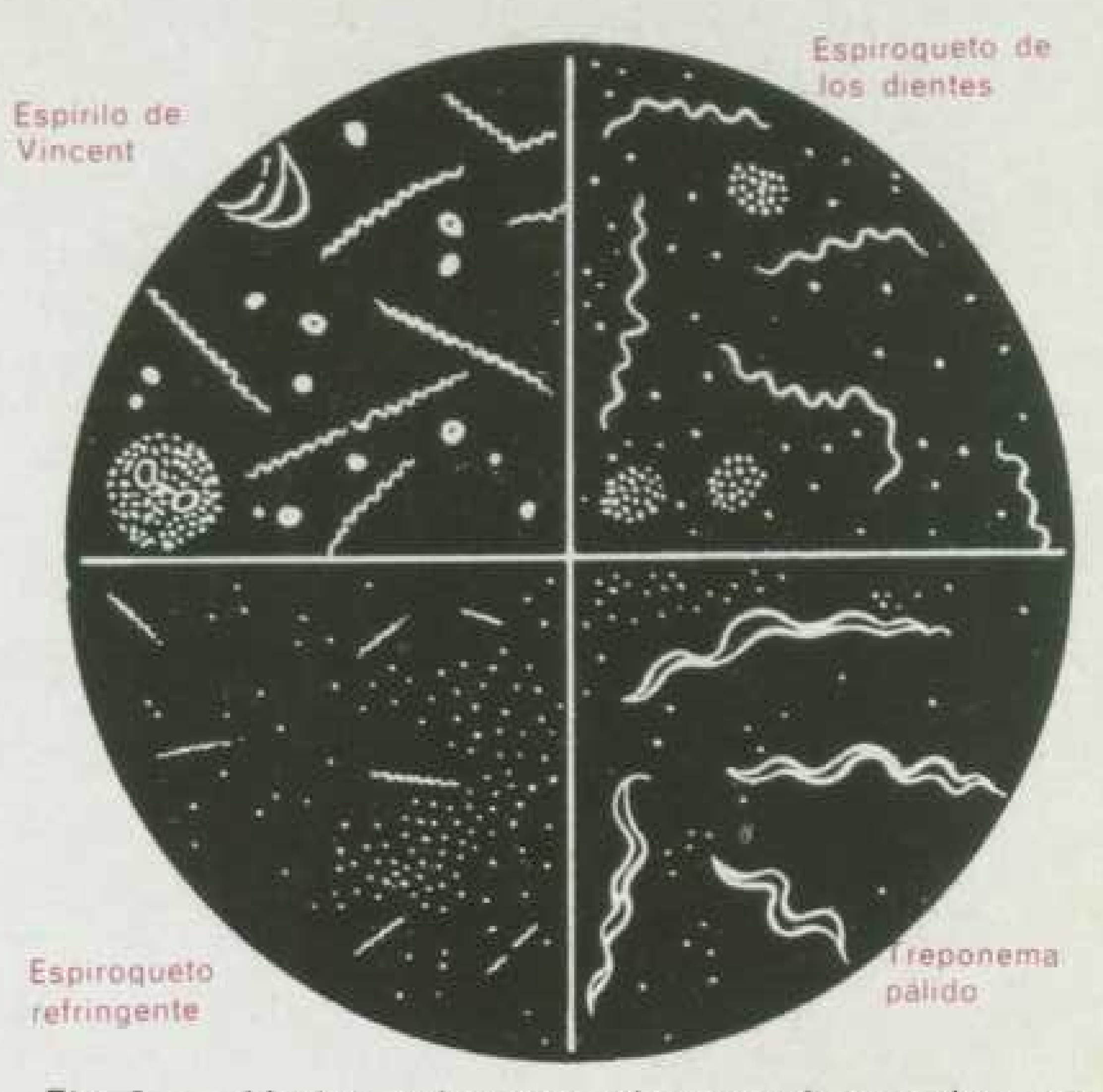


Fig 2. — Varios microorganismos observados en tinción negativa.

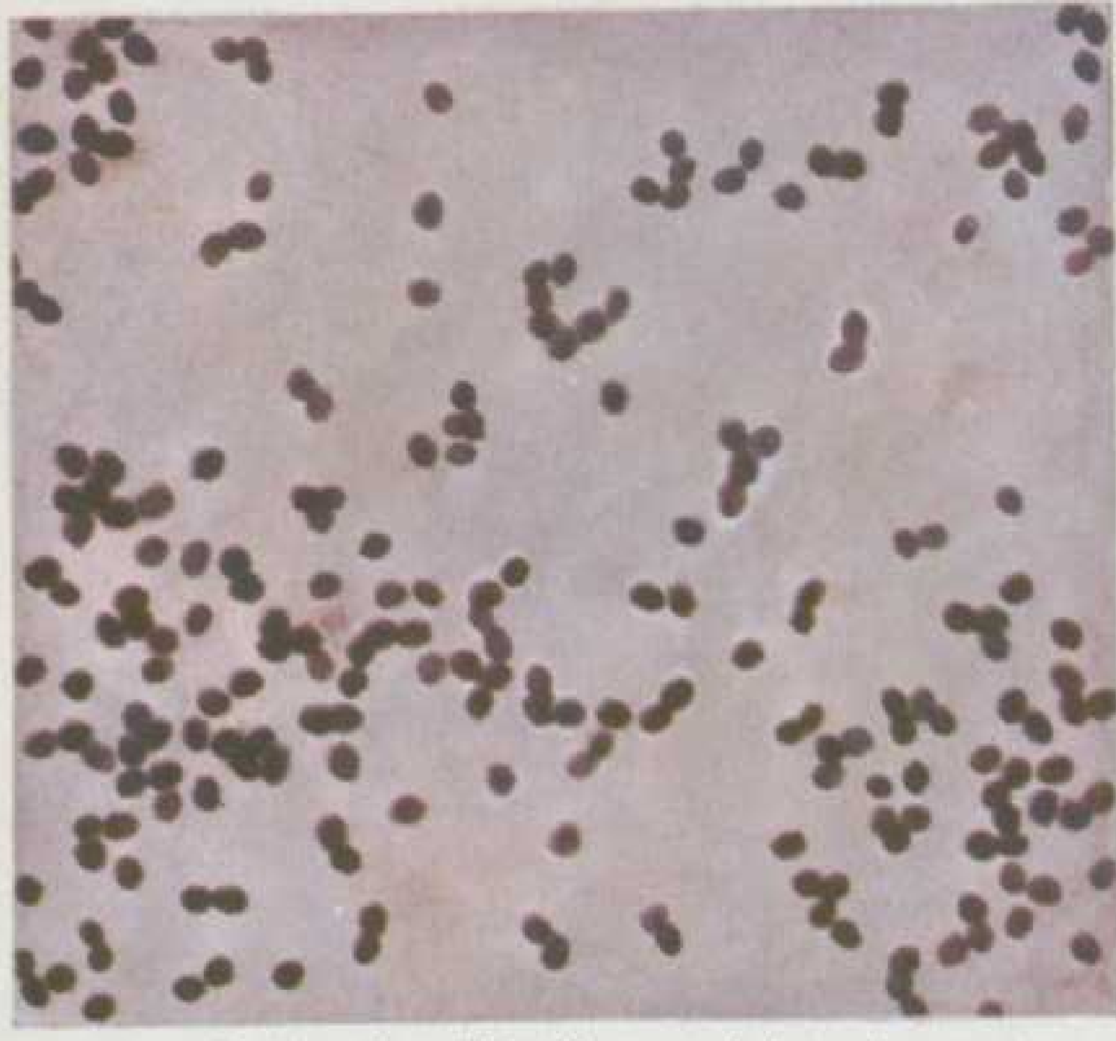


Fig. 3. — Colibacilos. Tinción por violeta de genciana.

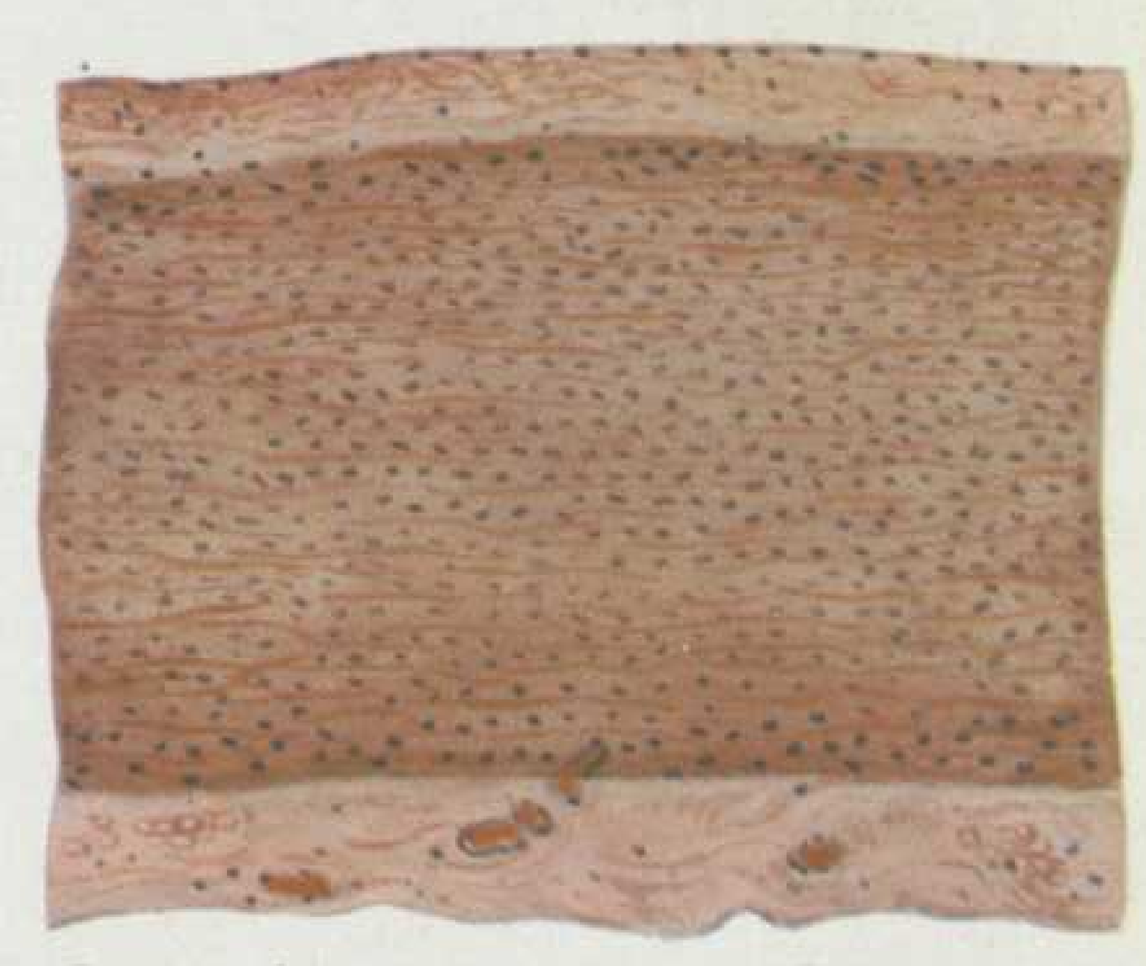


Fig. 4. — Corte de la arteria aorta. Tinción por hematoxilina férrica y eosina.

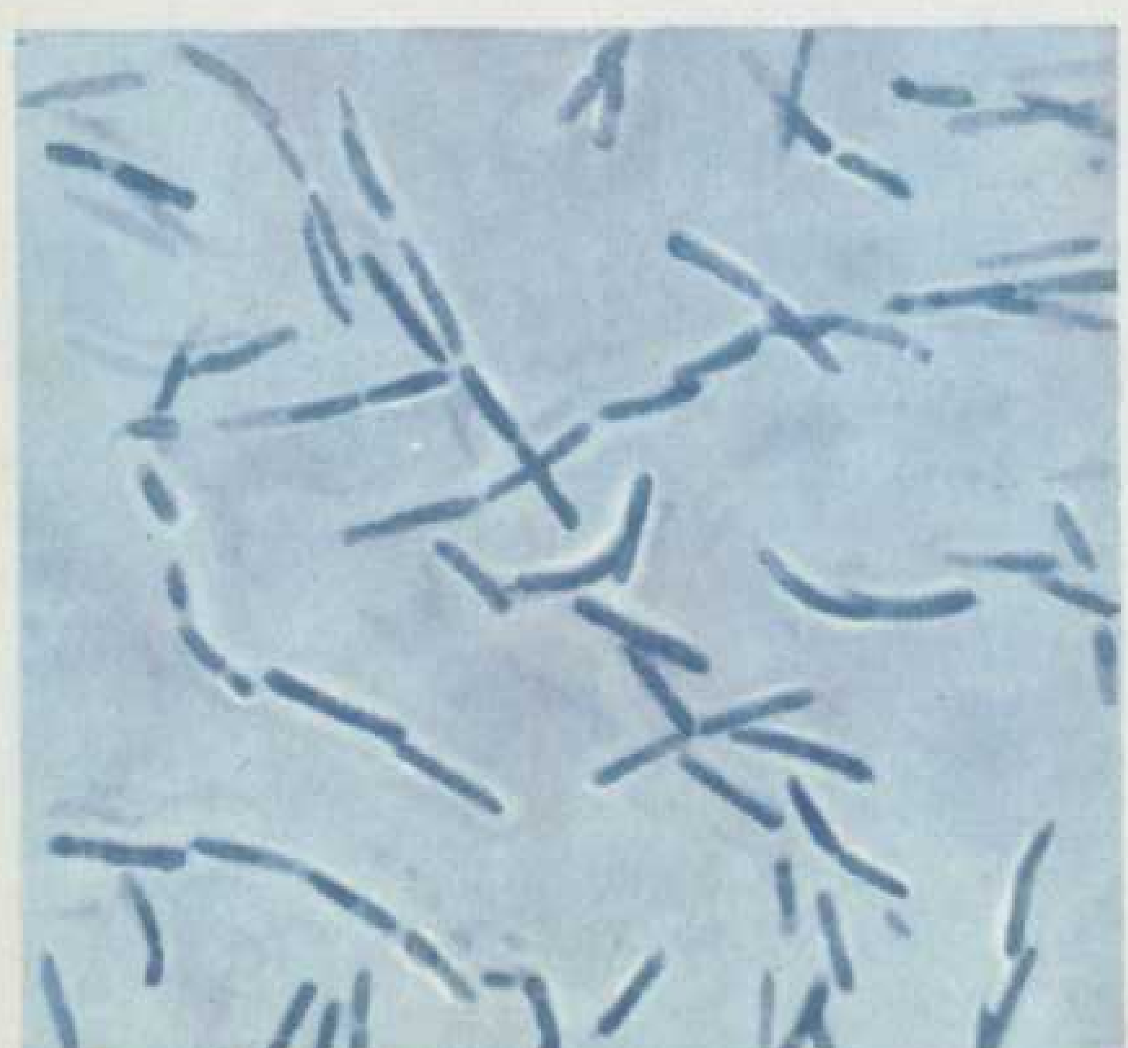


Fig. 5. — Bacteria carbuncosa, en bastoncitos. Tinción por azul de metileno.

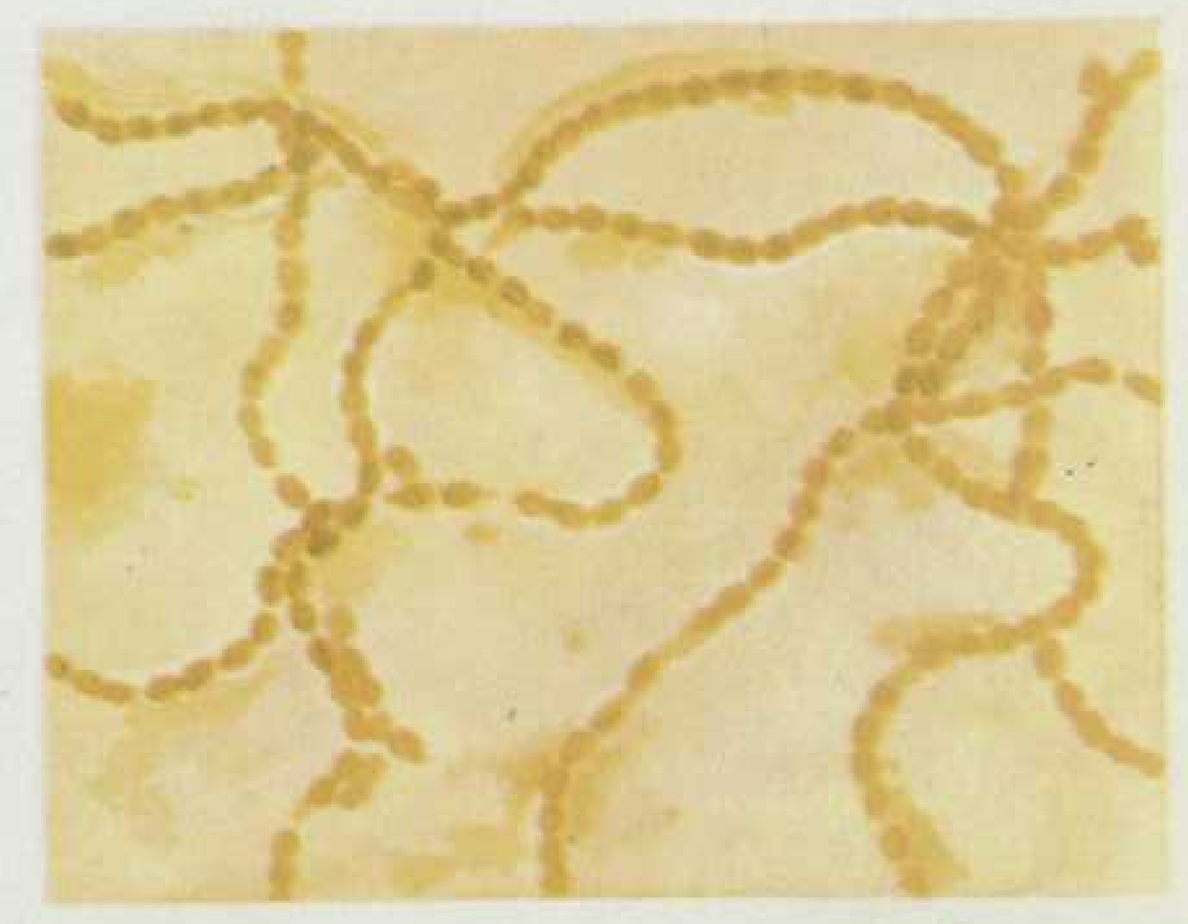


Fig. 6. — Bacteria carbuncosa, en cadenas de cocos. Tinción por ácido pícrico.

MONTAJE

Si se desea conservarlas, las preparaciones deben hacerse de tal manera que no se alteren ni se decoloren. Para cocnseguirlo ha de recurrirse al montaje. Son en gran número los métodos para hacerlo. Su elección depende del material que se trate de montar.

Montaje en gelatina glicerinada

Los objetos que deben ser montados por este medio se preparan húmedos. Antes del montaje se les puede macerar en lactofenol, o bien en líquido glicerinado o acetificado, pero nunca en alcohol.

Técnica. Con una aguja o lanceta se pone una porción de gelatina glicerinada encima del porta. Se calienta suavemente, hasta que la gelatina se funde, pero sin que llegue a hervir. Se introduce el material de estudio en el centro de esta masa, se tapa con un cubre calentado de antemano suavemente y se deja enfriar. (Fig. 1, A.) Se pone encima del cubre un pequeño peso para uniformizar la preparación y eliminar la gelatina glicerinada sobrante. Para evitar evaporaciones, se pasa por los bordes del cubre, con un pincel fino, barniz, resina o colodión. (Figura 1, B.)

Montaje en resina

Puede efectuarse en frío o en caliente, según la naturaleza del material. Como las resinas son insolubles en el agua, todos los materiales destinados a ser montados deben ser previamente deshidratados, pasándolos a través de diversos alcoholes concentrados, de menos a más, siendo el último el alcohol absoluto, y después se pasan asimismo por aceites esenciales (bergamota, canela, cedro, lavanda, girasol, etc.).

Actualmente se encuentran en el mercado muchas resinas que dan buenos resultados para el montaje: resina de Sammar, cumarone, hyrax, colofonia, terebentina de Venecia, resinas acrílicas, etc.

El procedimiento es casi idéntico al que se sigue con la gelatina glicerinada: se pone una gota en el centro de la preparación, la cual se calienta, y seguidamente se tapa.

Montaje en bálsamo del Canadá

Su nombre no es el apropiado, pues no se trata de un bálsamo, sino de una resina que se extrae de unas coníferas americanas *(Abies Canadensis, Abies balsamea).*

Es muy refringente y transparente; de aquí su gran aceptación en Microscopía. En el comercio se halla en forma de bálsamo natural siruposo, bálsamo seco y bálsamo disuelto en xilol. Recomendamos esta última forma.

Técnica. Se pone una gota de bálsamo en el centro de un porta bien seco. El objeto que se ha de montar, impregnado en xilol, se introduce en la gota y, con las precauciones necesarias, se tapa con el cubre, haciendo con él ligera presión para lograr un espesor uniforme. Cuando es preciso montar diatomeas, frotis secos, han de eliminarse totalmente el aire y la humedad mediante una gota de xilol. Una vez hecho esto, se pone el bálsamo, debiendo tenerse en cuenta que la cantidad de éste debe estar en consonancia con el tamaño del cubre y el espesor del objeto. Es conveniente dejar secar la preparación durante 24 ó 48 horas antes de guardarla, para evitar que cualquier movimiento del cubre la altere.

Montaje de objetos en seco

Ciertos objetos, como escamas de mariposas, radiolarios, etc., que pueden ser observados con luz reflejada, se ponen en el interior de una célula más o menos profunda confeccionada con barniz. Con un pincel empapado en barniz se dibuja encima del portaobjetos un círculo o cuadro cuyo espesor será mayor o menor, según el número de capas que se le den. Se coloca el objeto en el centro de esta célula, inmovilizándolo con un poco de agua albuminosa o de goma arábiga. Antes de taparlos se calientan ligeramente el porta y el cubre. Los bordes de éste se barnizarán también, para lograr un mejor ensamblaje. (Fig. 2.)

ETIQUETAJE

Toda preparación que haya de guardarse (fig. 4) debe ser etiquetada con su nombre y lugar, fecha y método empleado para su tinción, y montaje. (Fig. 3.) Ello, con el mayor cuidado.

TECNICAS DE OBSERVACION

TECNICA DE LAS PREPARACIONES

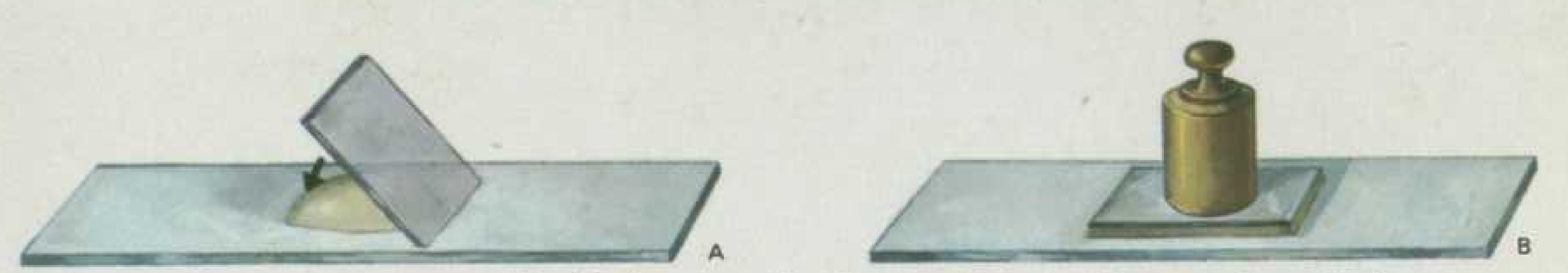


Fig. 1. — Montaje de una preparación. En A, colocación del cubreobjetos; en B, prensado mediante una pesa.

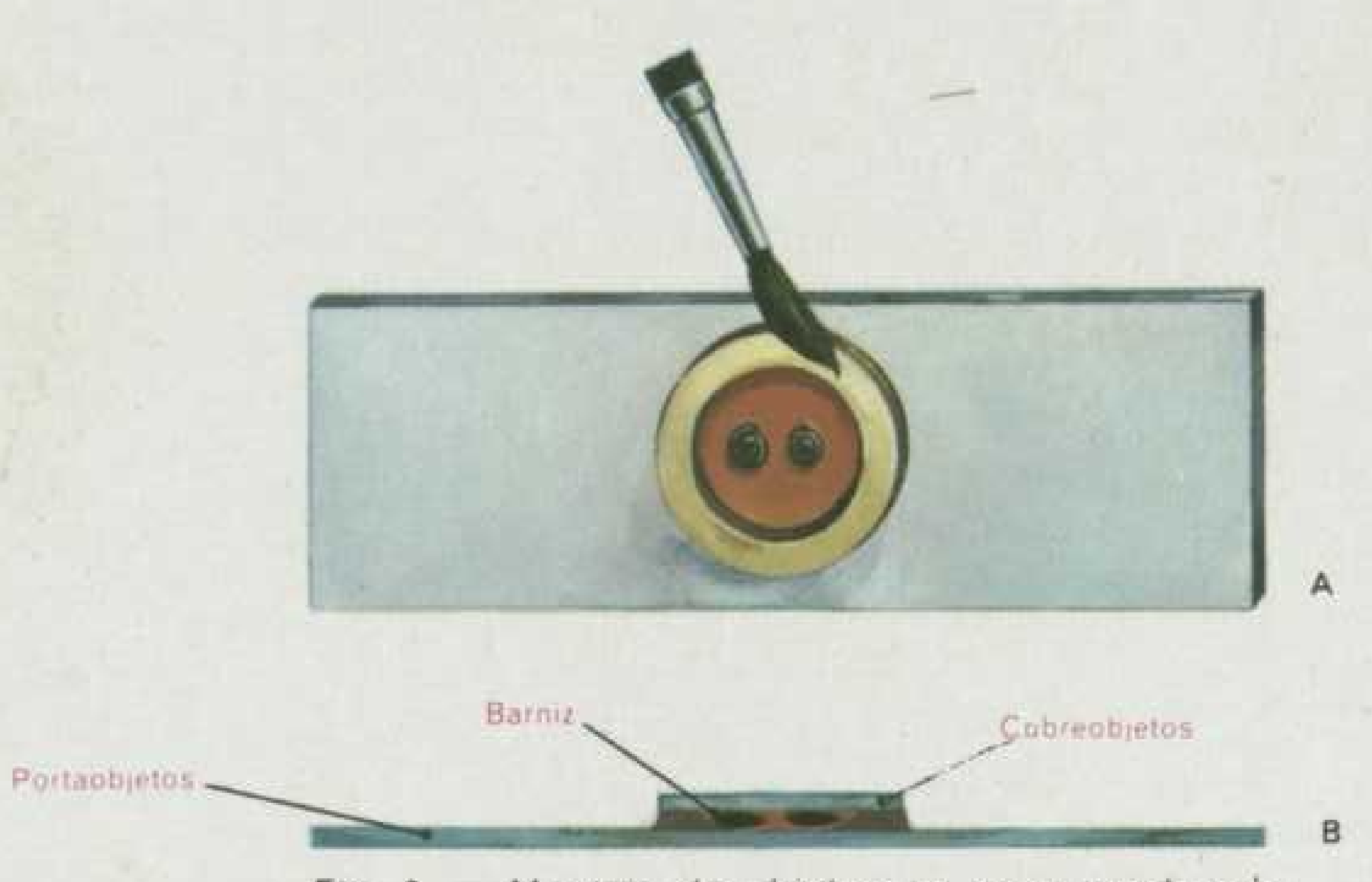


Fig. 2. — Montaje de objetos en seco mostrando la cámara con la preparación. En A, barnizado; en B, corte tranversal de la misma.



Fig. 3. — Etiquetaje correcto de una preparación.

Fig. 4. — Caja para guardar preparaciones.

BACTERIOLOGÍA

BACTERIAS

Organismos unicelulares microscópicos, incluidos en la Clase Esquizomicetos por sus analogías con los hongos inferiores. Tienen estructura muy sencilla, membrana evidente, protoplasma en el que se observan granulaciones metacromáticas y vacuolas, y núcleo poco o nada diferenciado. Algunas especies tienen la propiedad de encapsularse (c é l u l a s fagocitarias) cuando las condiciones ambientales les son adversas.

Son de forma cocácea, bacilar y espirilácea. Se reproducen por esquizogonia. Según la forma en que se escinden y la dirección en que lo hacen, crean agrupaciones celulares que tienen importancia en sistemática para la identificación de la especie: diplococos, estafilococos, estreptococos, tétradas y sárcinas, etc. Algunas especies forman esporas muy resistentes a los agentes físicos y químicos, y permanecen en estado de vida latente por tiempo indefinido. Cuando las circunstancias les son favorables, regeneran nuevas bacterias.

Ciertas especies se mueven por impulso de cilios y flagelos, polares o repartidos por toda su superficie. (Fig. 1.)

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las bacterias son los organismos que más abundan en la Naturaleza. Las encontraremos en cualquier lugar: tierra, aire, hielos, aguas marinas y fluviales, aguas termales, fondos marinos, en los charcos de agua estancada, en las aguas residuales, etc., y en mayor número allí donde se acumulen detritos orgánicos. Esto tiene mucho interés para la observación microscópica, pues, dado su pequeño tamaño, si la muestra no es muy rica en bacterias, será muy difícil observarlas.

Se emplean diversos sistemas para concentrarlas en número suficiente. Uno de ellos consiste en centrifugar el líquido que las contenga mediante una centrifugadora (fig. 2) y recoger el sedimento con una pipeta. Es método para observaciones rápidas; casi siempre, el mejor es el de los cultivos en medios líquidos o sólidos.

En los medios líquidos invaden todo el medio y, por ser sumamente abundantes, se depositan en el fondo del recipiente. En los medios sólidos, cada bacteria desarrolla una colonia perfectamente visible, aislada y típica de cada especie. Son, pues, aconsejables los medios sólidos. (Figs. 3 y 4.)

ESTUDIO EN VIVO

Se utiliza el método de la gota pendiente. (Fig. 5.) Se emplea preferentemente para observar la motilidad bacteriana. Su observación requiere objetivos fuertes e intensa iluminación. Su transparencia dificulta su visión.

Para el estudio de la morfología bacteriana es más aconsejable servirse de preparaciones teñidas. Para ello tenemos que extender las preparaciones, fijarlas, secarlas y teñirlas encima de un portaobjetos. La toma y extensión del material, proceda de cultivos sólidos o líquidos, debe efectuarse con un asa de platino, que habrá de ser flameada hasta el rojo sombra después de cada manipulación.

Extensión

Se pone una gota del líquido que se ha de examinar en un extremo del porta, y con el asa se extiende lo más fina y ampliamente posible. (Fig. 6.) Si el líquido que debe extenderse procede de un medio de cultivo, será preciso realizar diluciones con agua o suero fisiológico estéril, y ello puede hacerse directamente encima del porta, poniendo las dos gotas, suero y material, una al lado de otra y mezclándolas totalmente con el asa.

Desecación

Se logra agitando la preparación al aire o por el calor suave de una llama.

Fijación

Puede obtenerse por el calor, al mismo tiempo que se seca, o también, y es lo más aconsejable, con alcohol-éter (mezclados en partes iguales). Se vierten algunas gotas encima de la preparación, las suficientes para cubrirla totalmente, y se deja secar. Se pueden combinar ambos métodos, cubriendo la preparación con alcohol y pasándolo por una llama. (Fig. 7.)

Coloración

Los exámenes de frotis bacterianos reclaman el método de coloración por dos razones. En primer lugar, porque aumenta la visibilidad de algunos elementos que no serían visibles sin la tinción; en segundo lugar, porque al tener, una vez teñidos, diferentes afinidades de colorantes, pueden diferenciarse algunos elementos que, sin colorear, parecerían iguales.

Se dispone de gran número de colorantes y hay numerosas técnicas de coloración. Su valor, sensiblemente igual, no se presta a una clasificación. Ahora bien, basta un pequeño número de colorantes para dominar la técnica de la tinción de bacterias. Salvo

BACTERIOLOGIA

BACTERIAS

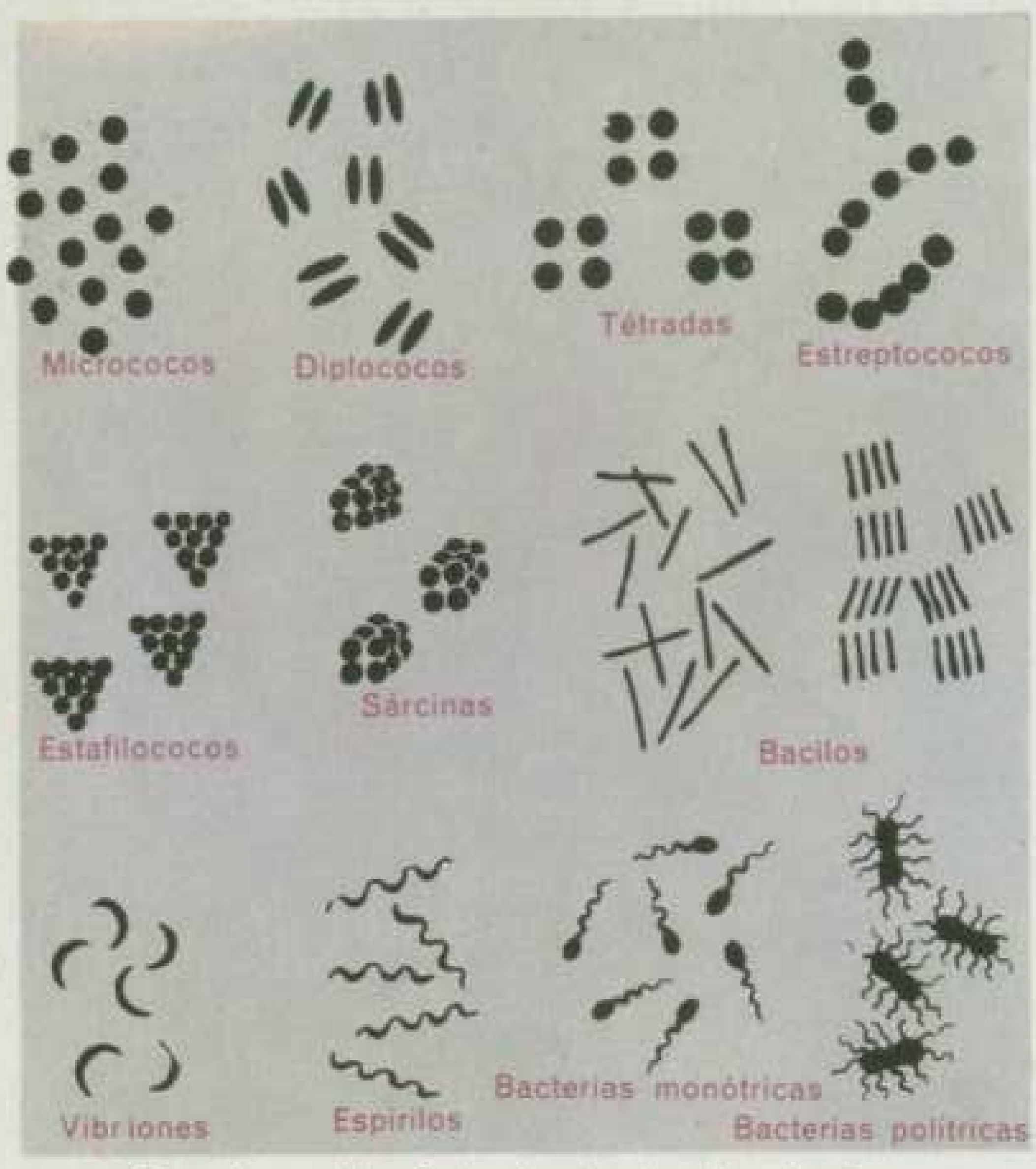


Fig. 1. — Morfología de las bacterias.

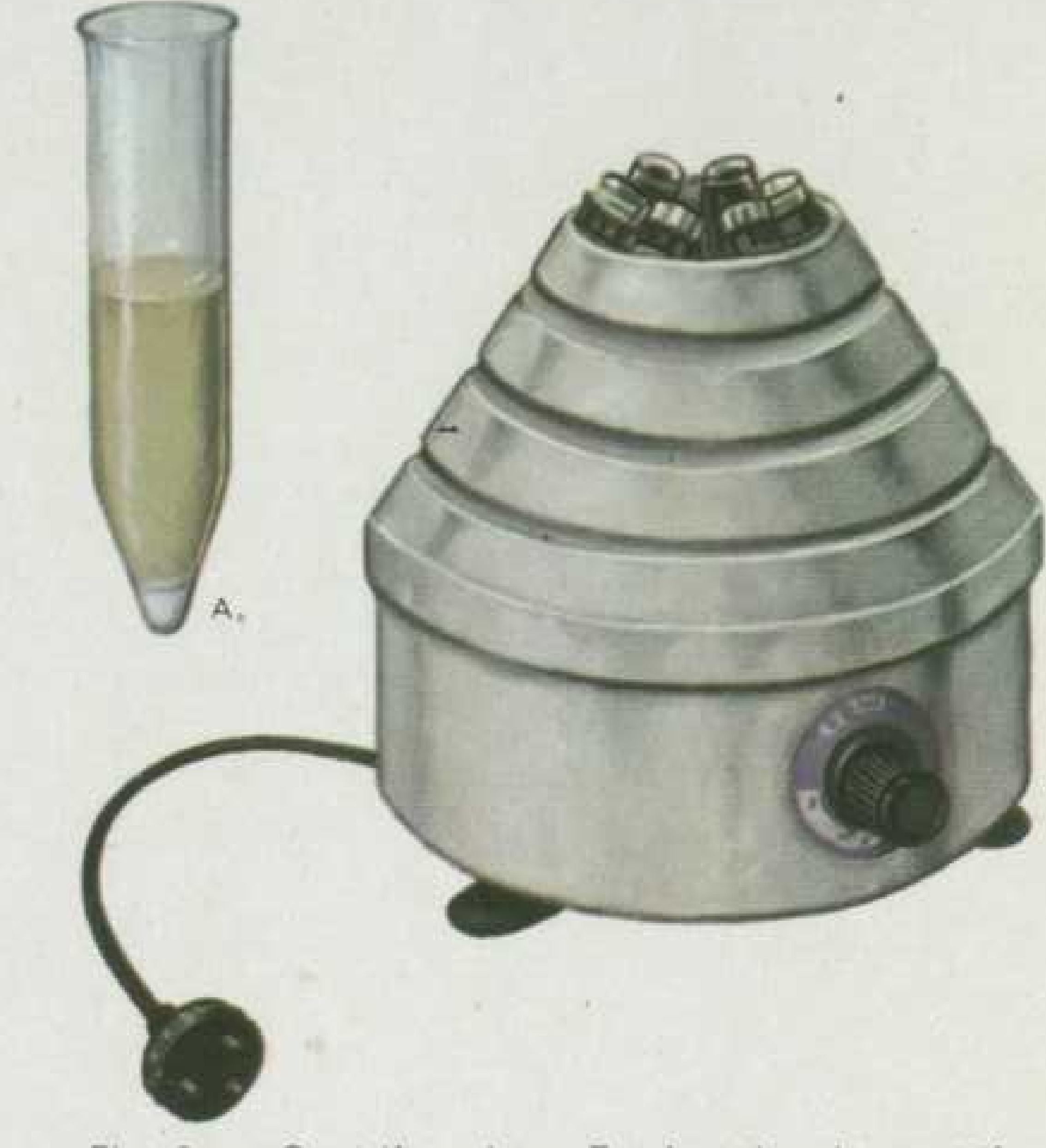


Fig. 2. — Centrifugadora. En A, tubo de centrifugadora con el contenido que se va a centrifugar.

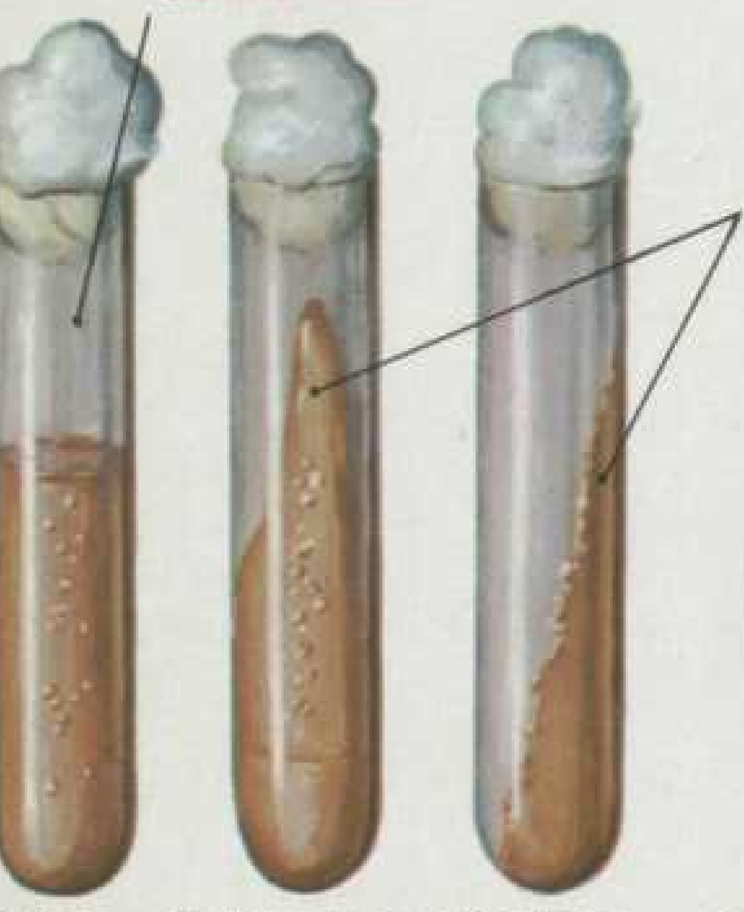


Fig. 3. — Tubos para siembras microbianas en gelatina o agar.



Fig. 4. — Cápsula de Petri con agar como medio de cultivo, en el que se han desarrollado colonias de bacterias.

Fig. 5. — Colocación de una preparación a gota pendiente en portaobjetos excavado.

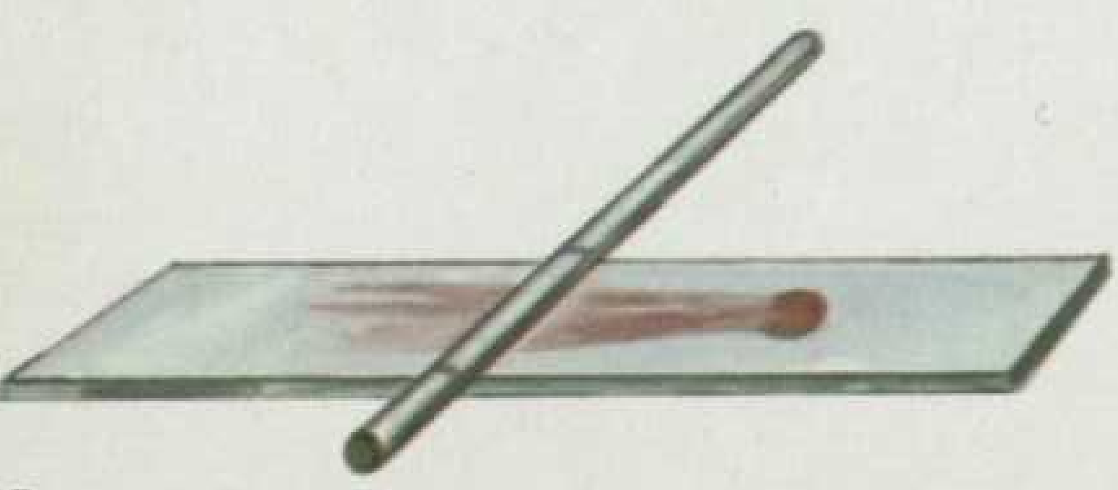


Fig. 6. — Extensión de una preparación sobre el portaobjetos simple mediante la varilla de cristal.



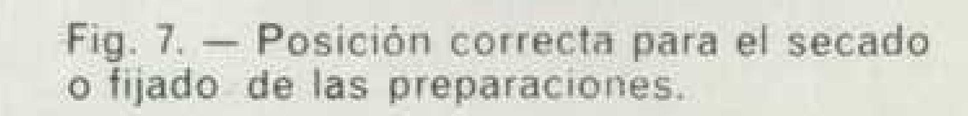


Fig. 7. — Posición correcta para el secado o fijado de las preparaciones.

casos excepcionales, la relación que damos a continuación será suficiente.

Pueden adquirirse en pequeños frascos de solución ya preparada para su uso o bien en soluciones concentradas, en polvo y en comprimidos para ser preparados en el momento en que hayan de emplearse. Es conveniente anotar en el frasco del colorante la fecha de la preparación, pues con el tiempo son fácilmente alterables.

Violeta de genciana fenicada

Solución saturada de violeta de genciana en alcohol . 10 ml.
Agua fénica al 1 % . . . 90 »

Modo de empleo. Fijada la preparación con alcohol-éter, se cubre de colorante durante un minuto. Se lava con agua destilada y se seca. Objetivo de inmersión.

Tionina fenicada

Tionina . . . . . . 0,50 gr.
Alcohol absoluto . . 10 »

Efectuada la solución, añádase lentamente:

Agua fenicada al 1 % . . 100 ml.

Modo de empleo. Se fija, se colorea durante cinco minutos, se lava y se deja secar. Es un excelente colorante tanto para microbios como para parásitos y células. Las bacterias se tiñen en color azul oscuro; los otros elementos, en color azul claro. (Figuras 1, 4, 5 y 6.)

Azul de metileno fenicado

Azul de metileno . . . . 1 gr.
Acido fénico cristalizado . 1 »
Alcohol absoluto . . . . 10 ml.

Se disuelve, y se añade poco a poco:

Agua destilada . . . . . 90 ml.

Modo de empleo. Igual que con los anteriores. Se deja actuar durante dos minutos.

Método de Gram

Es un método de diferenciación que permite clasificar gran número de bacterias en grampositivas y gramnegativas, según tomen o no el colorante.

Se emplean tres soluciones:

a) Violeta de genciana fenicada.
b) Solución Lugol:
Yoduro potásico . . 2 gr.
Yodo . . . . 1 »
Agua destilada . . . 100 ml.
c) Alcohol-acetona:
Alcohol absoluto . . . 90 ml.
Acetona . . . . . . 30 »

Modo de empleo. Se fija la preparación mediante calor o alcohol-éter y se cubre con unas gotas de solución de violeta de genciana durante dos minutos. Se vierte el exceso de colorante por inclinación. Sin lavar la preparación, se le añaden unas gotas de Lugol hasta que se vuelve de color pardo. Se deja escurrir el resto de Lugol y se añade alcohol-acetona hasta que la preparación se decolora. Se lava y, seguidamente, se colorea con fucsina o safranina durante dos minutos. Se vuelve a lavar con agua y se seca.

Los microbios grampositivos quedan teñidos en violeta. Los gramnegativos aparecen en color rojo. (Fig. 2.)

Fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen

Se emplea para teñir los bacilos acidorresistentes, como el de Koch y el de Hansen.

Este método se funda en el hecho de que, si se fuerza su coloración, las bacterias a las que, en condiciones ordinarias, tiñen difícilmente los colorantes básicos de la anilina retienen la materia colorante de tal modo que no consiguen decolorarlas decolorantes enérgicos como el alcohol y los ácidos diluidos. Por tanto, los gérmenes corrientes no retienen el color, y sólo los acidorresistentes persisten teñidos.

Se emplean las siguientes soluciones:

a)
Fucsina . . . . 1 gr.
Ácido fénico cristalizado . 5 »
Alcohol absoluto . . . . 10 »
Agua destilada . . . . . 100 »

b)
Ácido nítrico . . . . . . 25 »
Agua . . . . 50 »

c) Azul de metileno fenicado.

Modo de empleo. Se fija al calor o con alcohol-éter. Se cubre de colorante (solución a), y se calienta en platinas calentadoras o a la llama, hasta que se desprenden vapores, pero evitando llegar a la ebullición. Si tiende a secarse, se cubre nuevamente de colorante. Al cabo de unos cinco minutos se decanta para dar salida al colorante sobrante y, sin previo lavado, se cubre la preparación con el decolorante (solución b). Se repite varias veces la operación hasta que la decoloración es casi total. Si quedasen sin desteñir algunos puntos de mayor grosor, no debe insistirse demasiado, para evitar desteñir totalmente el resto de la preparación. Se lava con mucha agua. Si este lavado hiciera reaparecer el color rojo, se añade nuevo decolorante Si, por el contrario, no aparece, una vez lavada se deja secar. Finalmente, se tiñe con el colorante de fondo, azul de metileno fenicado. Los bacilos acidorresistentes aparecerán en rojo, y los demás elementos y el fondo, en azul. (Fig. 3.)

Atlas de MICROSCOPIA

POR F. J. BERNIS MATEU, LICENCIADO EN FARMACIA

BACTERIOLOGIA

BACTERIAS

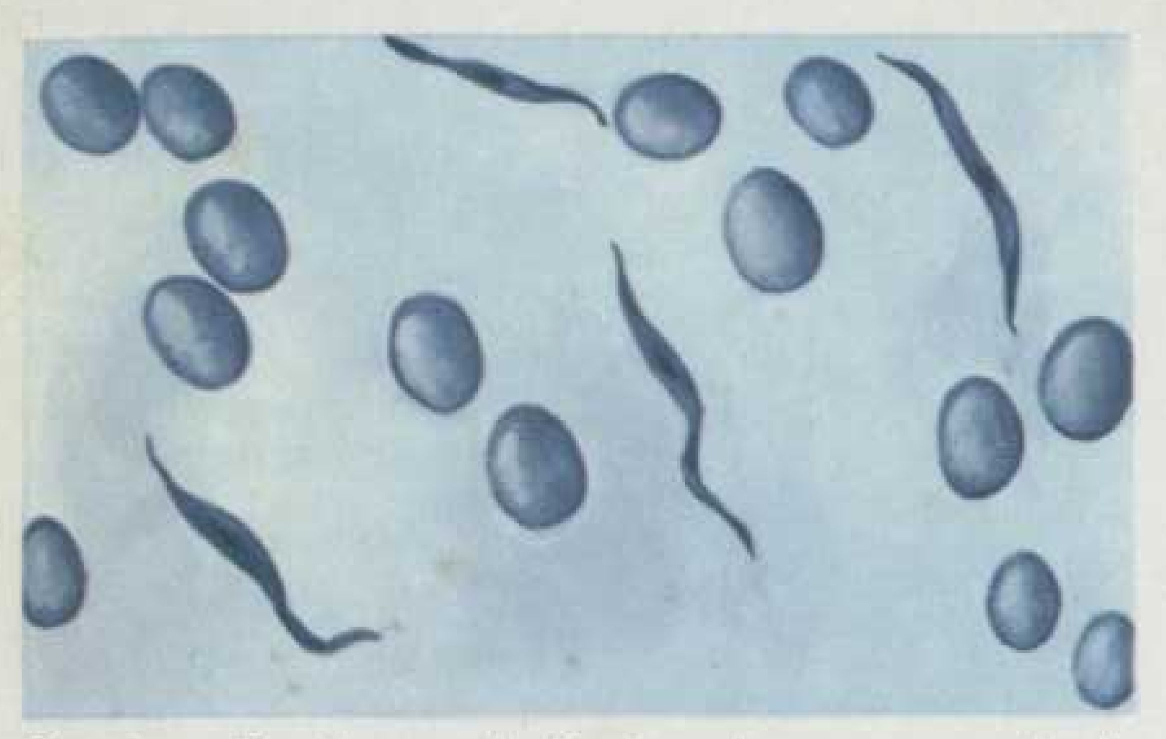


Fig. 1. — Tinción por la tionina de un preparado de sangre con protozoos.

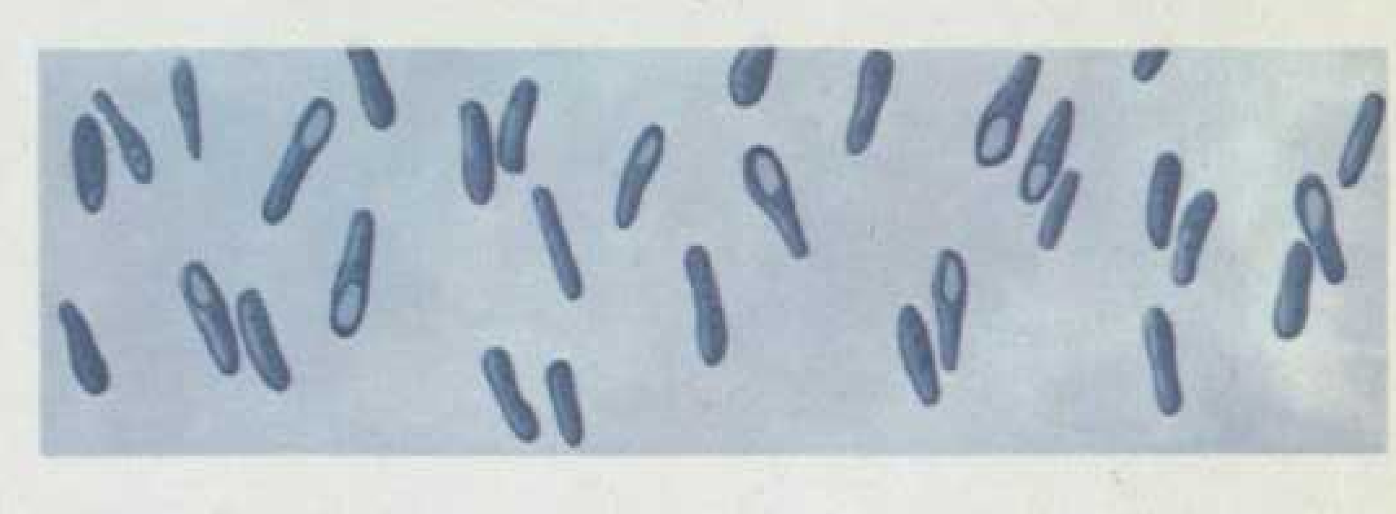


Fig. 2. — Tinción por el Gram. En A, gonococos, no se tiñen; por lo tanto, son *gramnegativos* En B, estafilococos, se tiñen: *grampositivos.*





Fig. 3. — Tinción por el método Ziehl para bacilos ácidorresistentes. En A, bacilo de Koch; en B, bacilo de Hansen.



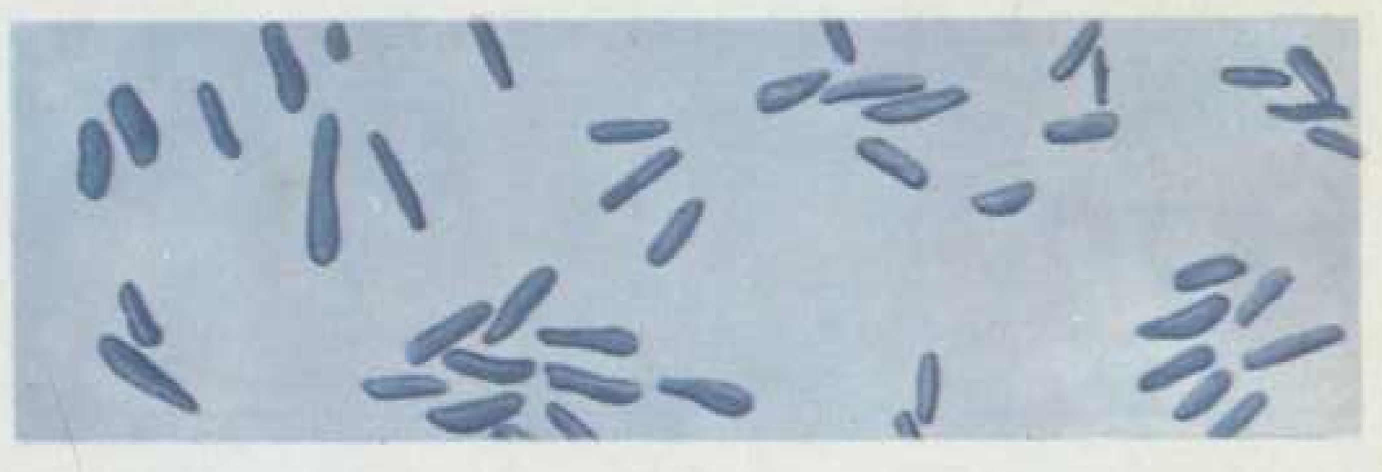




Fig. 4. — Preparaciones teñidas por la tionina.

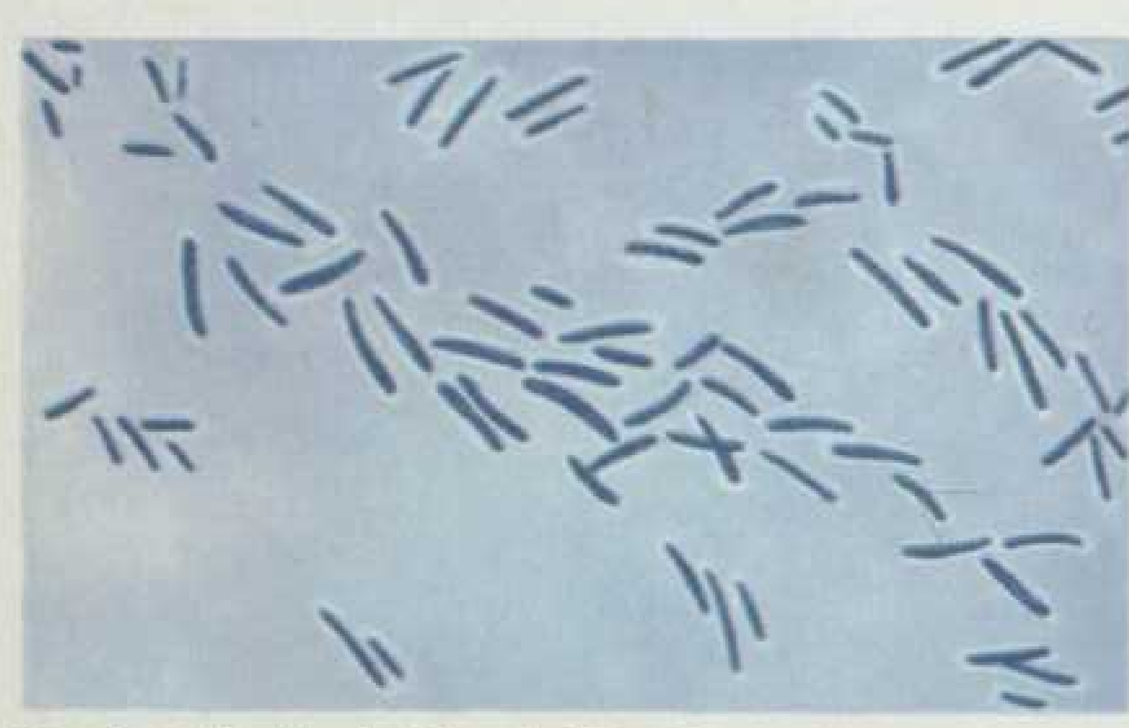


Fig. 5. — Bacilo de Eberth. Tinción mediante la tionina.

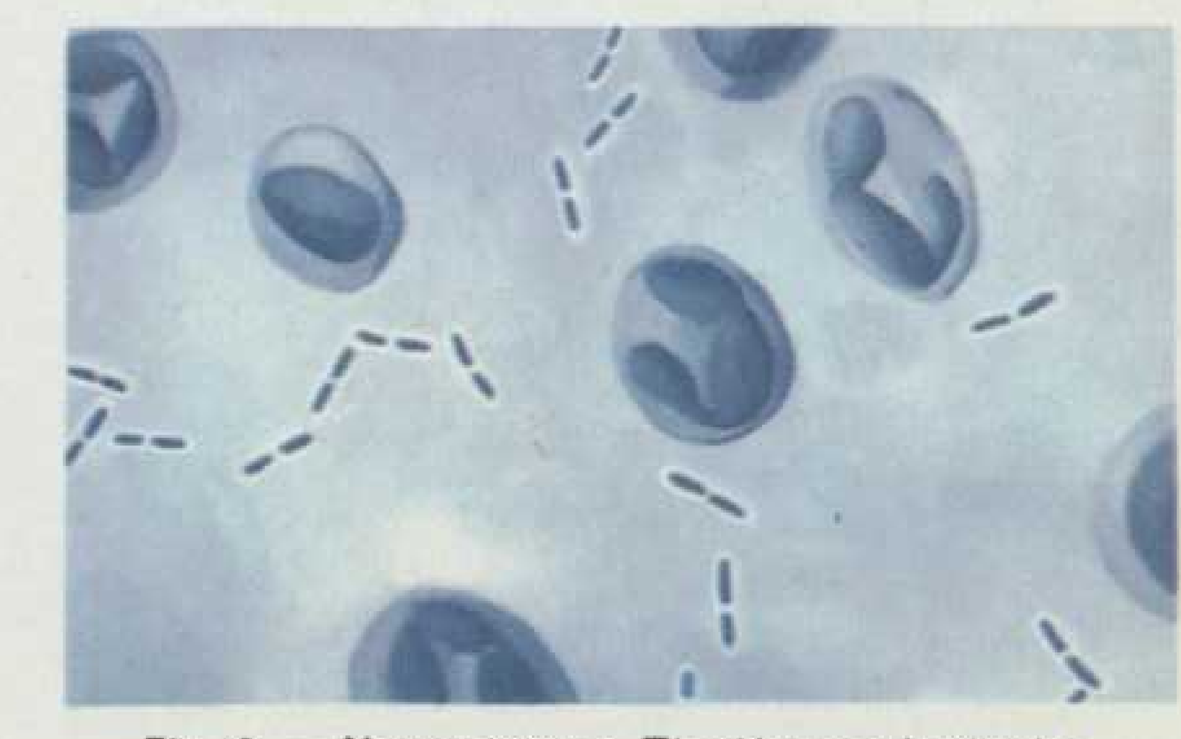


Fig. 6. — Neumococos. Tinción por la tionina.

BACTERIAS MÁS FRECUENTES

Son de mencionar cuando menos, constituyendo un buen material de estudio: *Bacterium coli, Bacillus subtilis, Micrococcus tetragenes, Staphilococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Clostridium, Streptococcus lactis, Mycobacterium tuberculosis.* (Lám. C/2, figura 3, A.) Esto aparte, nos detendremos mayormente en las que siguen, no menos frecuentes:

Espiroquetos

Son organismos en forma espirilada, flexibles y móviles, con movimientos de reptación y rotación y violentos latigazos. (Figs. 1, 3 y 4.) No se les observa núcleo preciso ni contienen pigmentos. Se reproducen por división transversal. Se les incluye entre las bacterias, aunque muestran sensibles diferencias con respecto a éstas por cuanto no son cultivables en los medios propios para ellas y responden a la quimioterapia, como los protozoos. Algunos autores los consideran filtrables por su propiedad de fragmentarse en gránulos que atraviesan los filtros. Estos gránulos, en condiciones óptimas, regeneran la especie.

Existen tres grupos muy interesantes desde el punto de vista patológico: Espironema, Treponema y Leptospira.

Espironema. Tienen la forma de espiras flexibles, anchas, en número de tres a cinco. Especie tipo: *Spirochaeta recurrentis* o *Borrelia recurrentis* (lámina C/4, figs. 1-4), que es el agente productor de la fiebre recurrente. Tamaño aproximado, 8 a 18 micras de largo por 0,25 de ancho. Se colorea por el método de Giemsa o por el de Fontana-Tribondeau. Se cultiva en medios que contengan suero.

Treponema. Tiene forma de espiras apretadas y terminadas en extremos afilados. Especie tipo: el *Treponema pallidum.* Agente productor de la sífilis. (Figs. 2 y 5.) Mide de 4 a 14 micras de largo, tiene los extremos muy afilados y, con ayuda del microscopio electrónico, se han observado en él haces de flagelos en ambos polos. Es muy difícil de teñir; el mejor procedimiento es el de Tribondeau, y también es bueno el de May-Grunwald-Giemsa. Se cultiva en medios que contengan suero.

Leptospira. La especie tipo es la *Leptospira icterohemorragica.* (Fig. 3.) Posee una serie de espiras primarias, muy apretadas, cuyas extremos terminan en forma de gancho. Mide de 6 a 9 micras de largo. Tiene movimientos de traslación y de rotación. Produce la enfermedad de Weil, caracterizada por ictericia, fiebre y hemorragia.

Se tiñe siguiendo los mismos procedimientos que con los anteriores.

Colorante de Tribondeau

Es una mezcla de eosinato de azul Borrell (azul de metileno con plata) y eosinato de azul ordinario disuelta en alcohol etílico absoluto glicerinado, que se encuentra ya preparado en el comercio.

Método. El colorante de Tribondeau fija y tiñe al mismo tiempo. Una vez extendida en el porta, la preparación que debe teñirse se deja secar al aire libre. No debe calentarse ni fijarse. Se opera en dos tiempos:

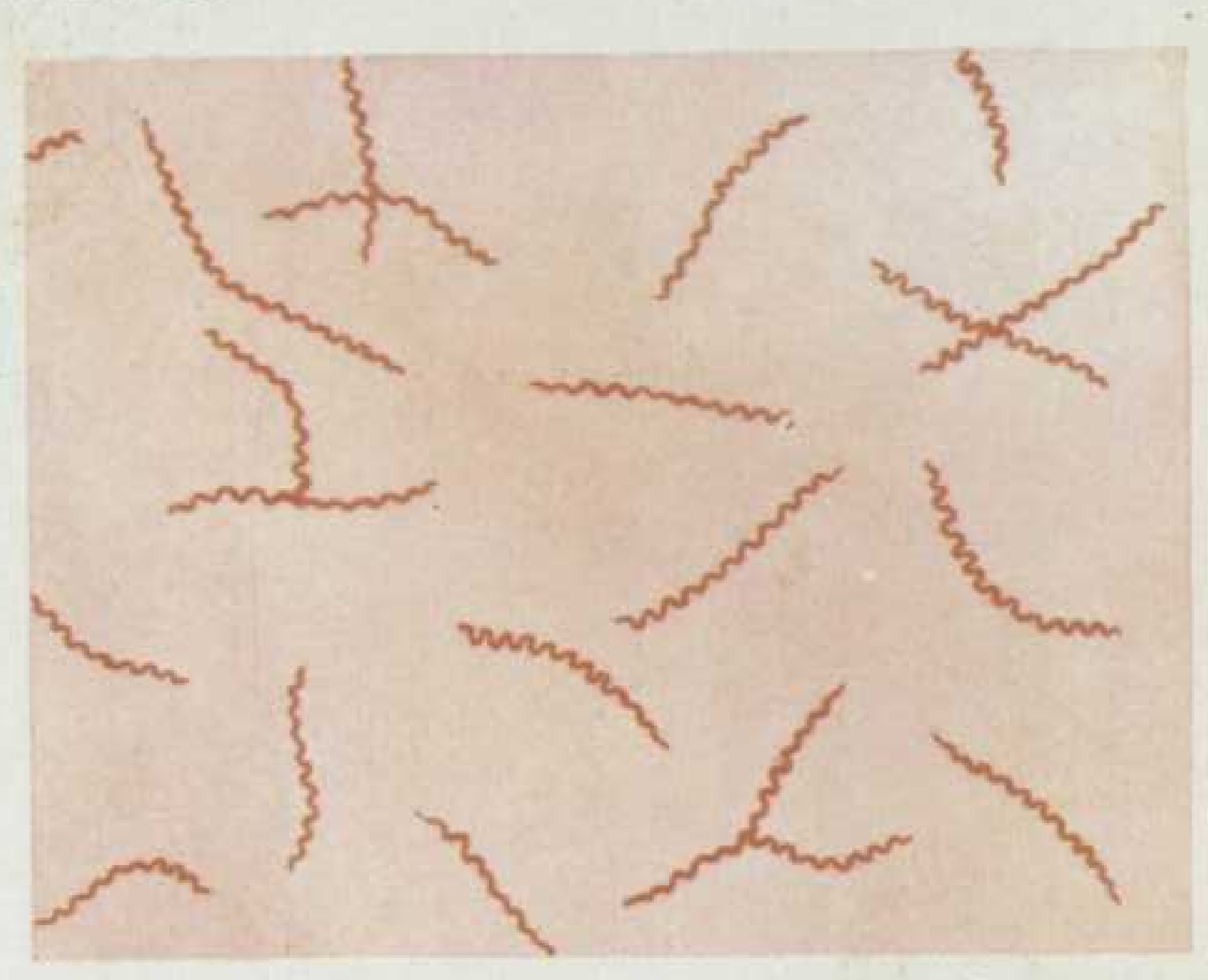
1.º Se pone la preparación, horizontal, encima de las varillas del cristalizador, se cubre con 5 a 10 gotas de colorante, que se deja actuar durante dos minutos, y se tapa todo con una campana para evitar una excesiva evaporación del alcohol.

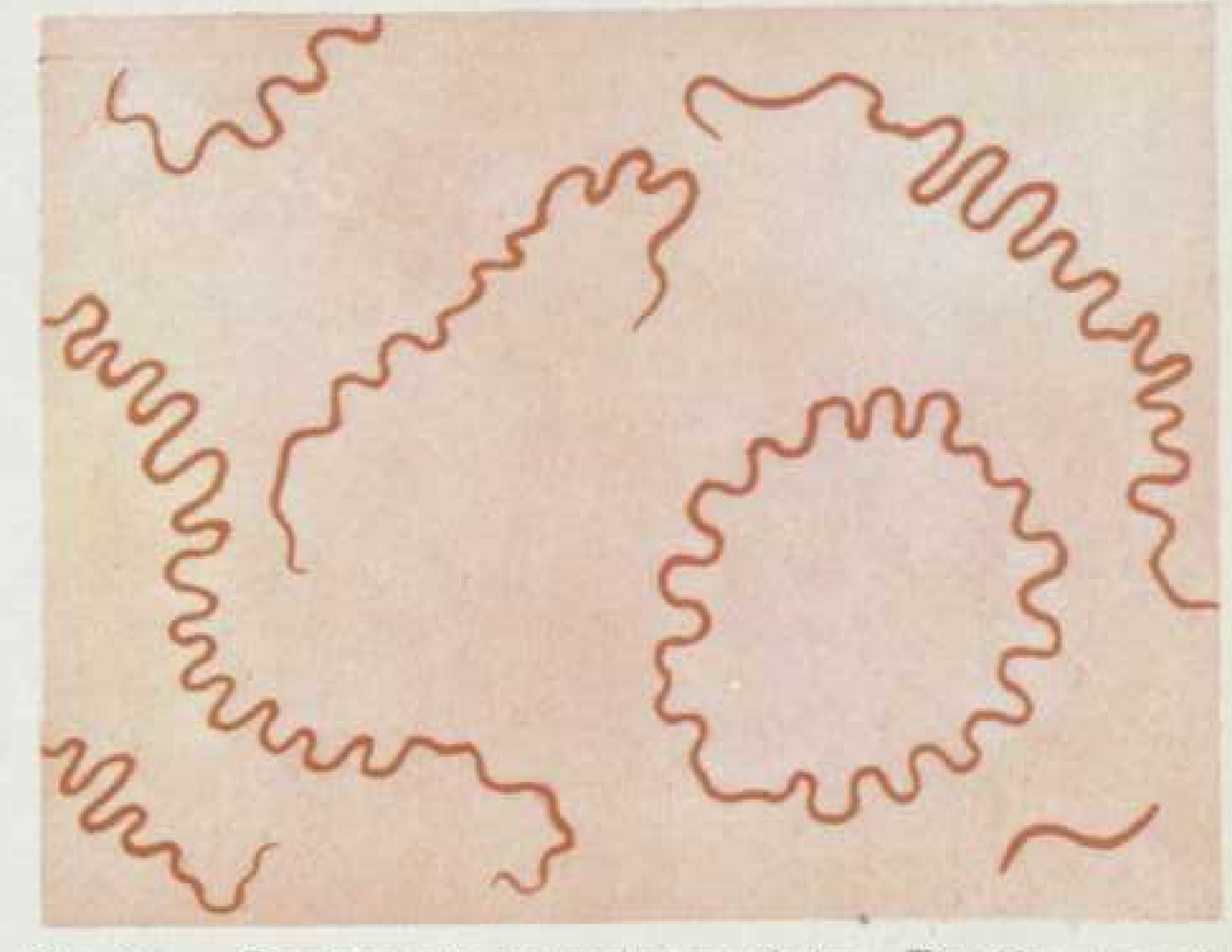
2.º Se añade, al colorante empleado, agua destilada, en la proporción de una gota de agua por cada dos del colorante. Mediante un movimiento de vaivén se logra que se mezclen el colorante y el agua. Se mantiene esta mezcla 10 minutos, si se trata de elementos que se tiñen con rapidez, ó 20 minutos si se trata de Treponemas y Leptospiras, que tardan más en teñirse. Transcurrido este tiempo, se lava la preparación con agua destilada y se seca, agitándola o insuflando en ella aire con una pera de goma. Puede ocurrir que sobre la preparación aparezca un fino precipitado que perjudicaría la observación; se elimina dejando actuar unos segundos alcohol de 70º y lavándola seguidamente con agua, aunque lo más práctico es empezar nuevamente.

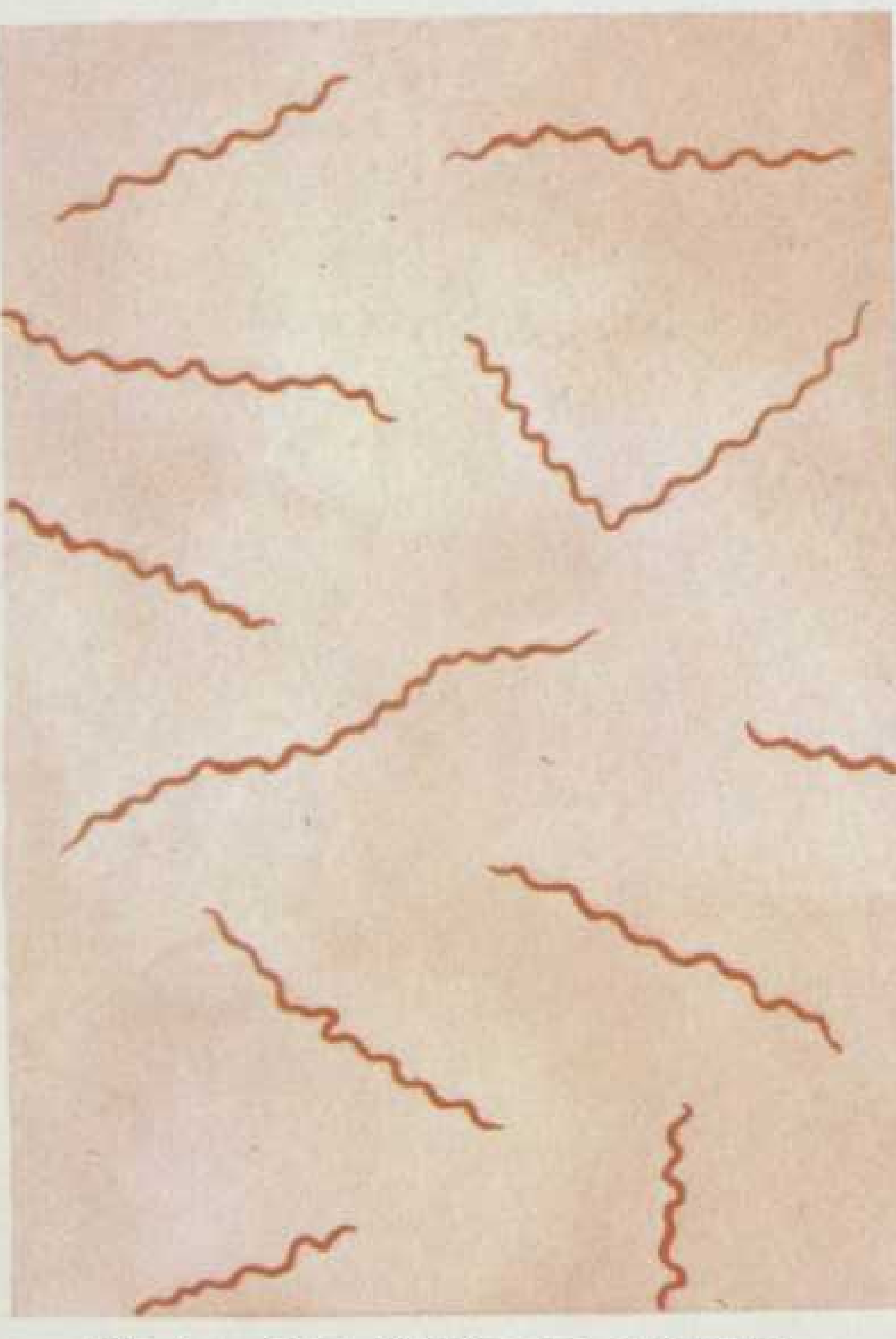
Con esta coloración se pueden ver las bacterias en azul o violeta; los parásitos, en detalle, y también en color violeta, y, por último, los espiroquetos y los espirilos en color rojo. Las células, la sangre, el pus, etc., aparecen con sus diferentes granulaciones e inclusiones teñidas. Una modificación de este método, y que da muy buenos resultados para la observación de Treponemas, es —véase a continuación— el de Fontana-Tribondeau.

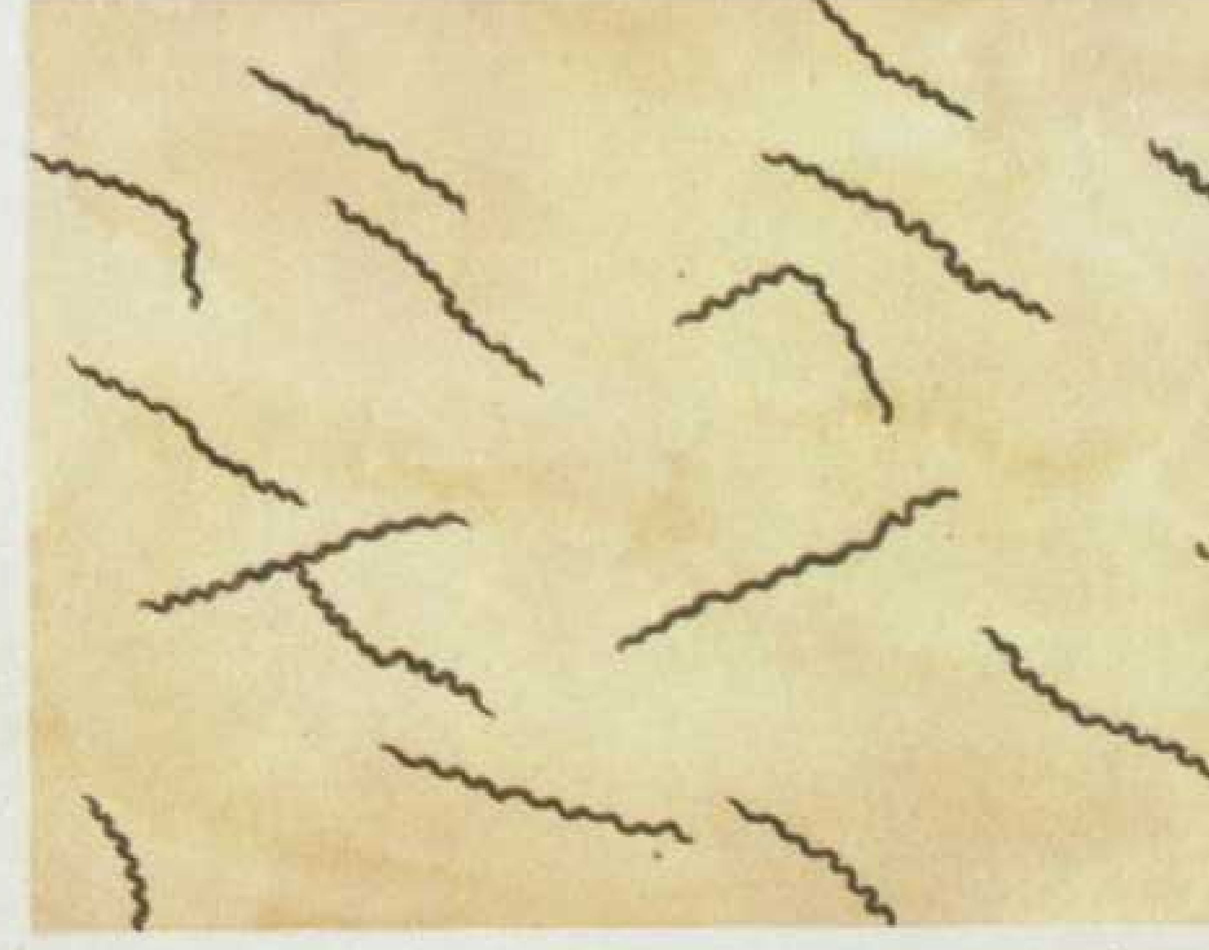
BACTERIAS


Fig. 1. — Un espiroqueto "visto" con el microscopio electrónico.


Fig. 2. — *Treponema pallidum.* Tinción con el Giemsa.


Fig. 3. — Espiroqueto icterohemorrágico. Tinción con el Giemsa.


Fig. 4. — Pian. Tinción con el Giemsa.


Fig. 5. — *Treponema pallidum* Tinción por el método Fontana. Triboudeau.

Método de Fontana-Tribondeau

Se funda en la eliminación de las células sanguíneas y la impregnación completa del treponema.

Son necesarios los siguientes reactivos:

1.º *Solución de Ruge*:

Acido acético	1 ml.
Formol al 40 %	2 »
Agua destilada	100 »

2.º Alcohol absoluto o de 96º.

3.º *Solución tánica*:

Acido tánico (tanino) . .	1 gr.
Agua destilada caliente. .	20 ml.

4.º *Solución de nitrato de plata*:

Nitrato de plata	1 gr.
Agua destilada	20 ml.

Se vierte casi toda esta solución en un vaso bien limpio y se conserva la cantidad restante. Se añade con una pipeta un poco de amoníaco puro y, agitando con una varilla de cristal, se formará un precipitado oscuro que se redisuelve al añadir amoníaco. A partir de este momento se pone lentamente amoníaco hasta que aparece una ligera opalescencia; si se vuelve totalmente transparente, se añade el resto de la solución, que se ha reservado hasta que aparece la opalescencia deseada.

Técnica. 1.º *Deshemoglobinización.* Se humedece la preparación con el líquido de Ruge, repitiendo la operación hasta que el líquido quede incoloro.

Se elimina el líquido sobrante. (No es preciso secar.)

2.º *Lavado y fijación.* Se vierte el alcohol sobre la preparación, que se tendrá inclinada. Se seca, quemando el alcohol sobrante, que se apaga rápidamente, soplando. De este modo, el calor moderado completa la fijación.

3.º *Mordiente.* Se recubre la preparación con solución de tanino y se pasa por la llama hasta que aquélla despide vapor, pero sin llegar a la ebullición. Se retira de la llama y se espera 30 segundos para verter la solución sobrante.

4.º *Lavado.* Se lava con agua corriente durante un minuto y se aclara con agua destilada. No es preciso secar.

5.º *Impregnación.* Es conveniente practicarla primero en frío, después en caliente. Se recubre la preparación con abundante líquido de Fontana, hasta que toma color castaño. Se deja escurrir el líquido. Se añade más solución de Fontana y se calienta suavemente hasta que despide vapor. Se espera 15 segundos y se escurre el sobrante.

6.º *Lavado y secado.* Se lava con agua destilada. Se seca por agitación o calor suave.

Se examina con objetivo de inmersión.

Resultado: Treponemas teñidos en color oscuro sobre fondo claro. (Lámina C/3, fig. 5.)

Colorante de Giemsa

Se puede adquirir ya preparado en el comercio, y puede emplearse con fijación previa o sin ella para teñir células, pero si se trata de teñir Treponemas se emplea una técnica algo diferente. El frotis, practicado cuidadosamente y con la mayor uniformidad, se deja secar al aire, y se fija posteriormente con alcohol absoluto durante media hora. En el momento de teñir, se mezclan en un recipiente:

Agua destilada	10 ml.
Solución de carbonato sódico al 1 %	10 gotas
Líquido de Giemsa . . .	10 »

Al añadir estas últimas se agita la preparación.

La preparación será sumergida en esta mezcla durante 45 a 60 minutos.

Se lava rápidamente con agua; se seca, también rápidamente, agitando; el examen se hace con objetivo de inmersión.

Los Treponemas se verán de color violeta o rojizo pálido; los glóbulos rojos, caso de haberlos, rosados, y los leucocitos aparecerán parduscos, con núcleo rojo oscuro y, a veces, azul. (Lámina C/3, figuras 2, 3 y 4.)

BACTERIAS

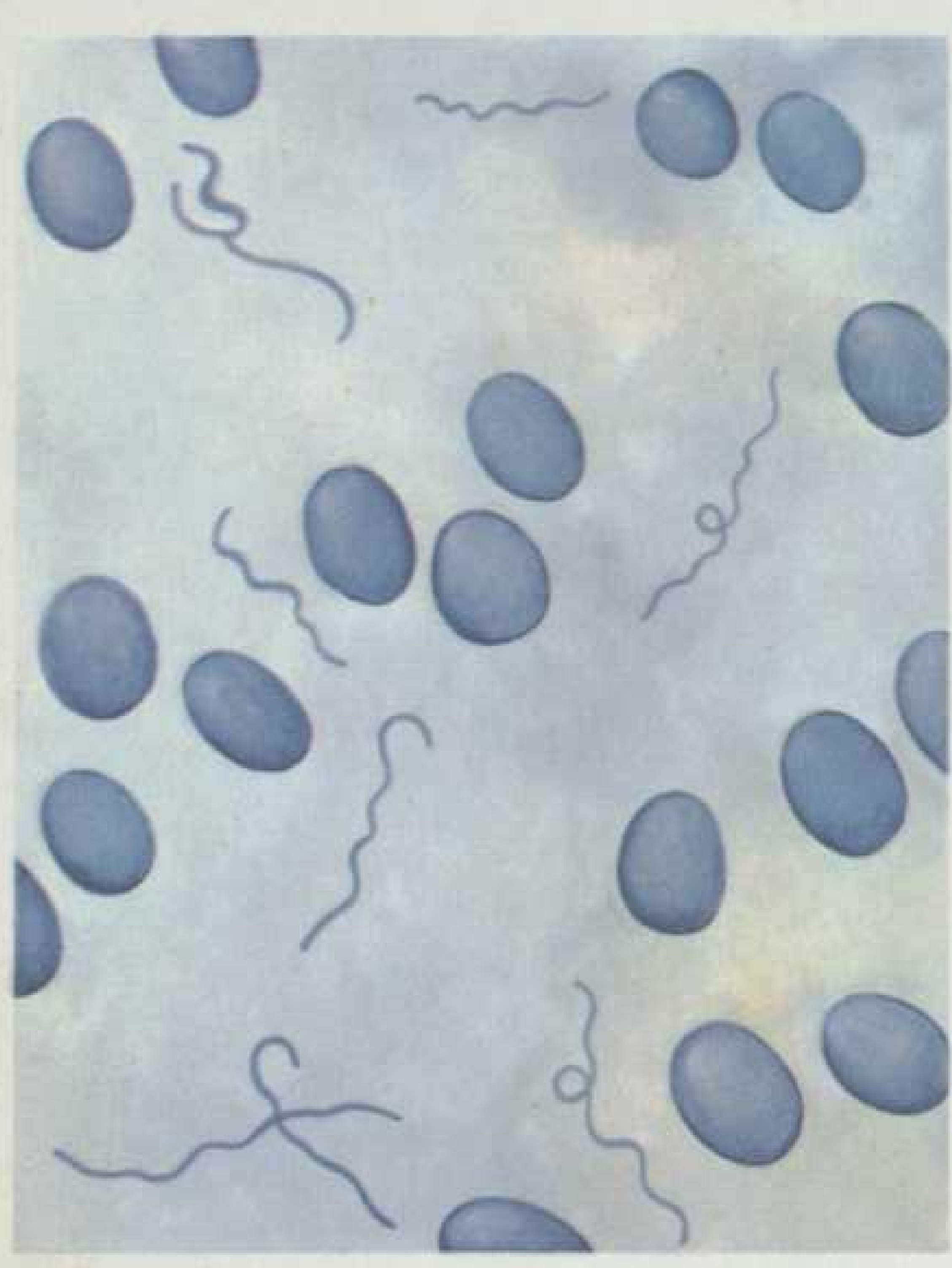


Fig. 1. — *Spirochaeta recurrentis* Tinción por la tionina.

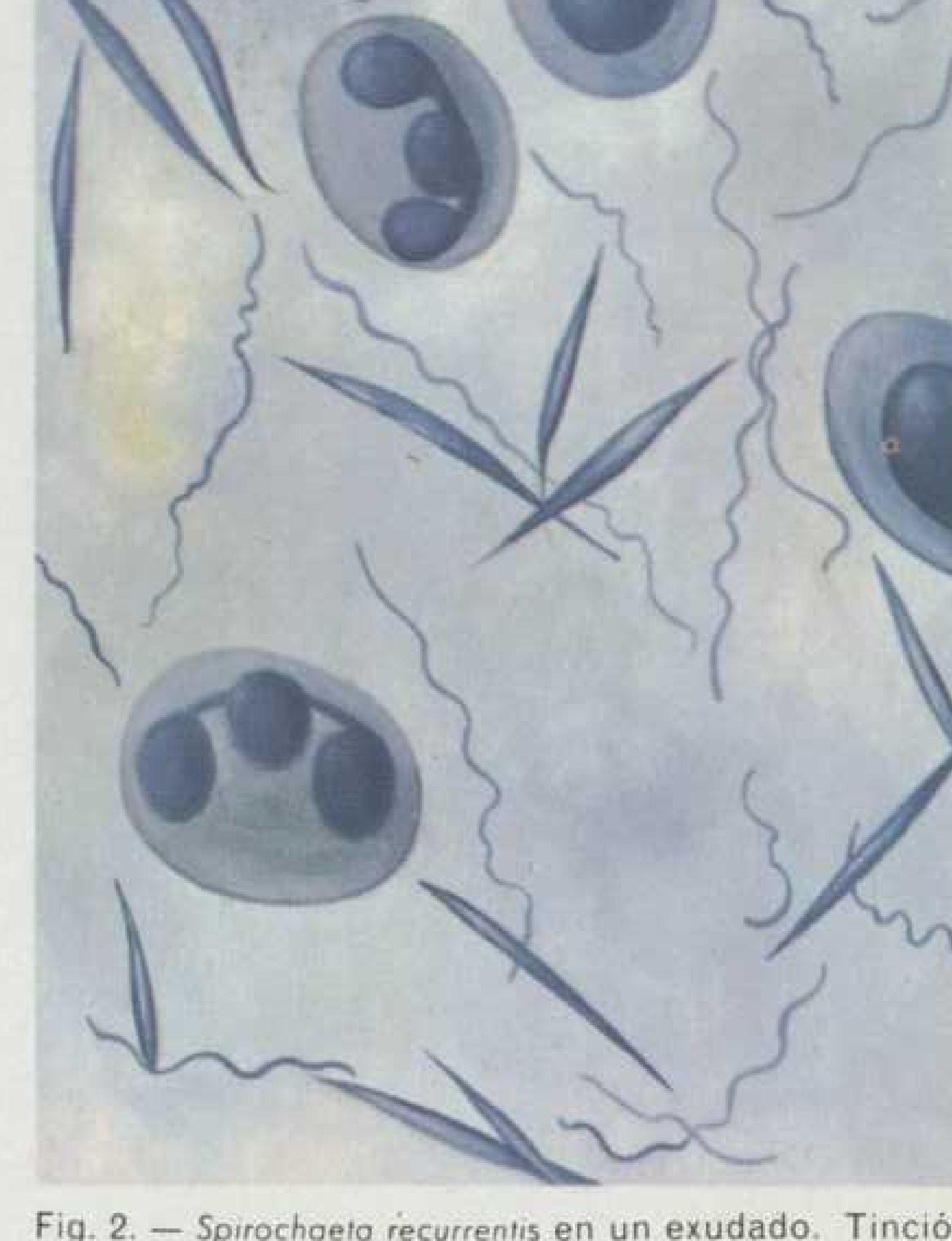


Fig. 2. — *Spirochaeta recurrentis* en un exudado. Tinción por la tionina.



Fig. 3. — *Spirochaeta recurrentis* Angina fusoespirilar de Vincent.

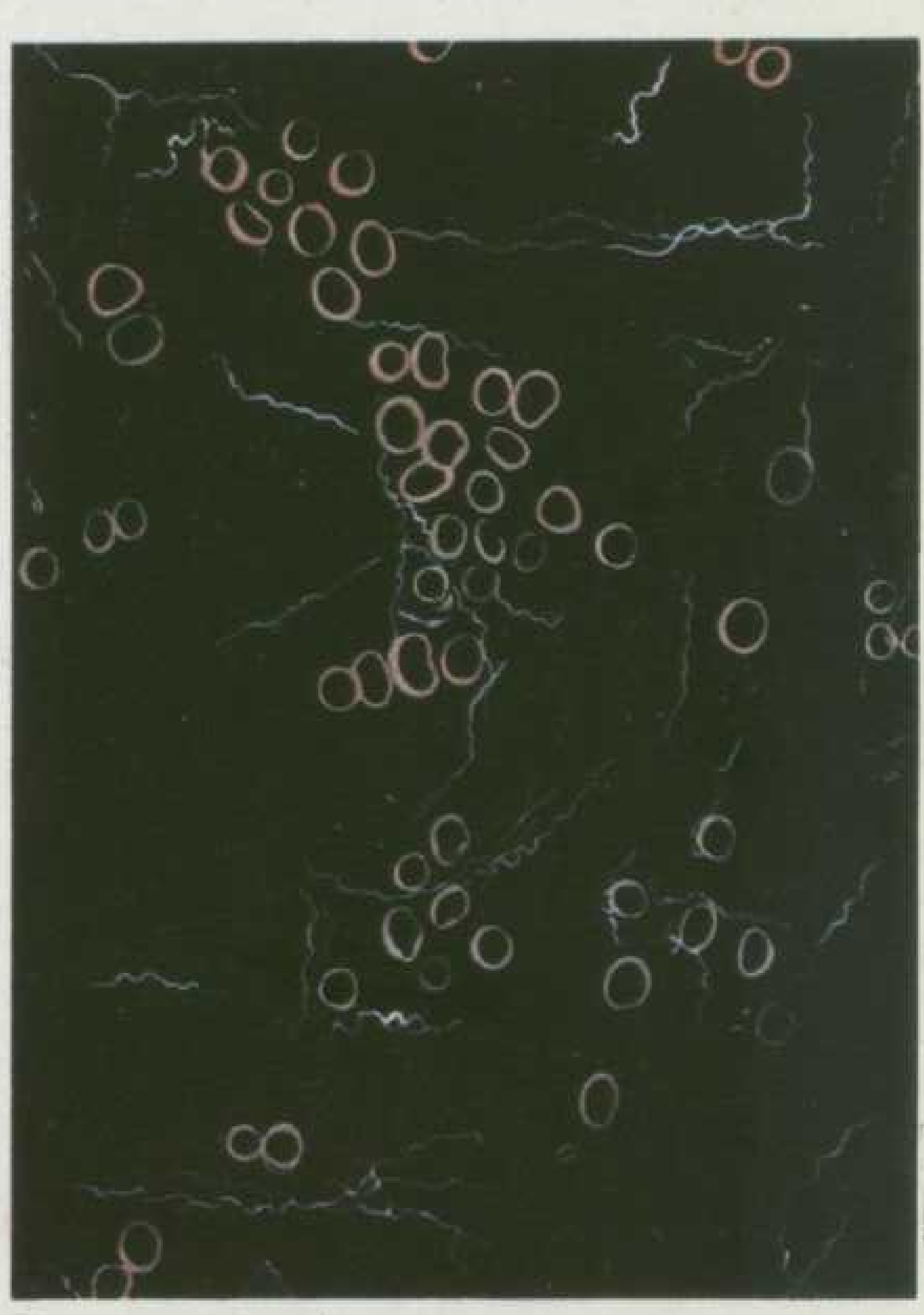


Fig. 4. — *Spirochaeta recurrentis* en sangre, vista sobre fondo oscuro.

BOTÁNICA

ALGAS MICROSCÓPICAS

Engloban una gran variedad de Clases, Familias y Géneros. En general, están abundantemente pigmentadas por clorofila, cianina, eritrocina y otros pigmentos, que permiten su observación sin necesidad de teñirlas. (Figura 1.) Otras veces será necesario conservarlas en preparaciones montadas, y entonces habrá que fijarlas, colorearlas y montarlas según técnicas apropiadas para cada grupo.

Observación en fresco. Pueden observarse Diatomeas, Desmidiáceas, Clorofíceas, etc., poniendo entre porta y cubre unas gotas del líquido que las contiene. En caso de ser muy escasas se puede centrifugar a pequeña velocidad, para no alterar sus estructuras, y observar el sedimento obtenido.

Para conservarlas un tiempo determinado, se emplean líquidos que evitan su descomposición en el frasco.

Líquido cuproacético:

Acetato de cobre . . .	0,10 gr.
Acetato potásico . . .	2 »
Agua	50 »

Glicerina fenicada:

Glicerina	10 gr.
Agua	90 ml.
Acido fénico	1 gr.

Fijación. Las algas microscópicas pueden fijarse por inmersión en una solución de quinona al 2 ó 4 por 100 recién preparada. También pueden fijarse con líquido cromo-acético (de muy buenos resultados en algas y organismos planctónicos).

Acido crómico al 1 % . .	70 ml.
Acido acético glacial . . .	3 »
Agua destilada	90 »

Otro fijador muy utilizado: el ácido pícrico en solución acuosa o alcohólica.

Lavado. Las algas fijadas con líquido cromo-acético o ácido pícrico deben lavarse abundantemente con agua durante varias horas. Se puede emplear un Erlenmeyer con tapón atravesado por dos tubos; el agua entra por uno y sale por otro. Antes se tapa el extremo del tubo de salida con un papel de filtro para evitar que salgan las algas.

Deshidratación. Es preciso deshidratar las preparaciones, para utilizar ciertos procedimientos de coloración, o para montarlas en resinas. Como el empleo del alcohol provoca fuertes contracciones de las membranas, hay que tratar primero las algas con una mezcla de glicerina y agua:

Agua	100 ml.
Glicerina	10 gr.

Se deja que el líquido se concentre en un secador que contenga cloruro cálcico o ácido sulfúrico. Una vez las algas empapadas de glicerina, se pueden tratar con los diferentes alcoholes sin temor a perjudicarlas.

Cianofíceas

Estas algas se distinguen de las demás por carecer de núcleo diferenciado y por el color verde azulado propio de la cianina y distinto del verde claro de la clorofila. (Fig. 2.)

Las Cianofíceas abundan en la tierra húmeda, sobre las rocas, en las aguas dulces y marinas, en las aguas termales, etc. Muchas especies forman parte del plancton vegetal. Las Oscilatorias filamentosas (fig. 3) forman tapices oscuros en el suelo húmedo, al pie de los muros sombreados, en el tronco de los árboles y en otros sitios húmedos. Algunas especies comunican al agua color, sabor y olor característicos. Examinadas en una gota de agua, se ve como sus filamentos oscilan lenta y continuamente. (Fig. 4.)

Las muestras frescas o preservadas en líquidos conservadores serán examinadas en una cápsula con un poco de agua destilada. Se separan unos de otros los filamentos. Se montan las muestras en agua formolada o en gelatina glicerinada. Las algas desecadas serán examinadas después de tratadas mediante agua con Lactofenol.

Coloración. Una vez fijadas, podemos teñirlas con carmín o, mejor, con hematoxilina de Erlich; fija y tiñe a la vez y se compone de:

Agua destilada	50 ml.
Alcohol absoluto	50 »
Glicerina	50 »
Acido acético	5 »
Hematoxilina	1 gr.
Alumbre, a saturación.	

Ya coloreadas, toman color marrón. Luego de lavarlas, éste tira a azul. La hematoxilina de Erlich puede emplearse para coloración en masa de algas.

Coloración al azul de metileno. Se fijan las algas con alcohol. Se colorean con azul de metileno disuelto en ácido clorhídrico al 0,5 por 100.

La cromatina se colorea de azul.

Coloración del protoplasma y el núcleo. Se fijan al picroformol, se lavan y se colorean con safranina verde luz:

Alcohol de 70°	100 ml.
Acido acético	3 »
Verde luminoso	0,1 gr.
Safranina	0,15 »

Este método de coloración varía en tiempo (de 20 minutos a 12 horas).

Se lavan las algas con alcohol de 70° y se montan en gelatina glicerinada.

ALGAS

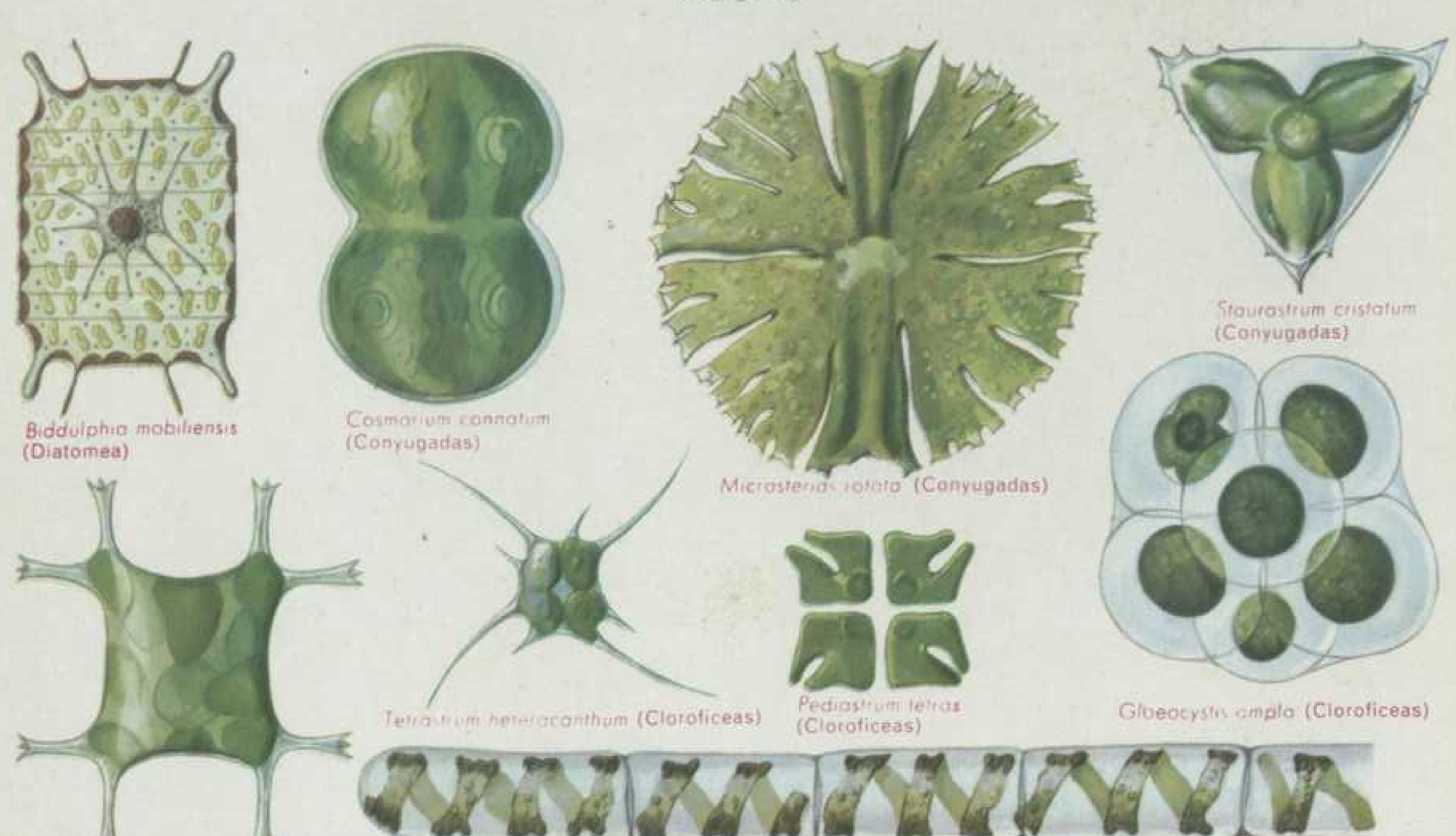
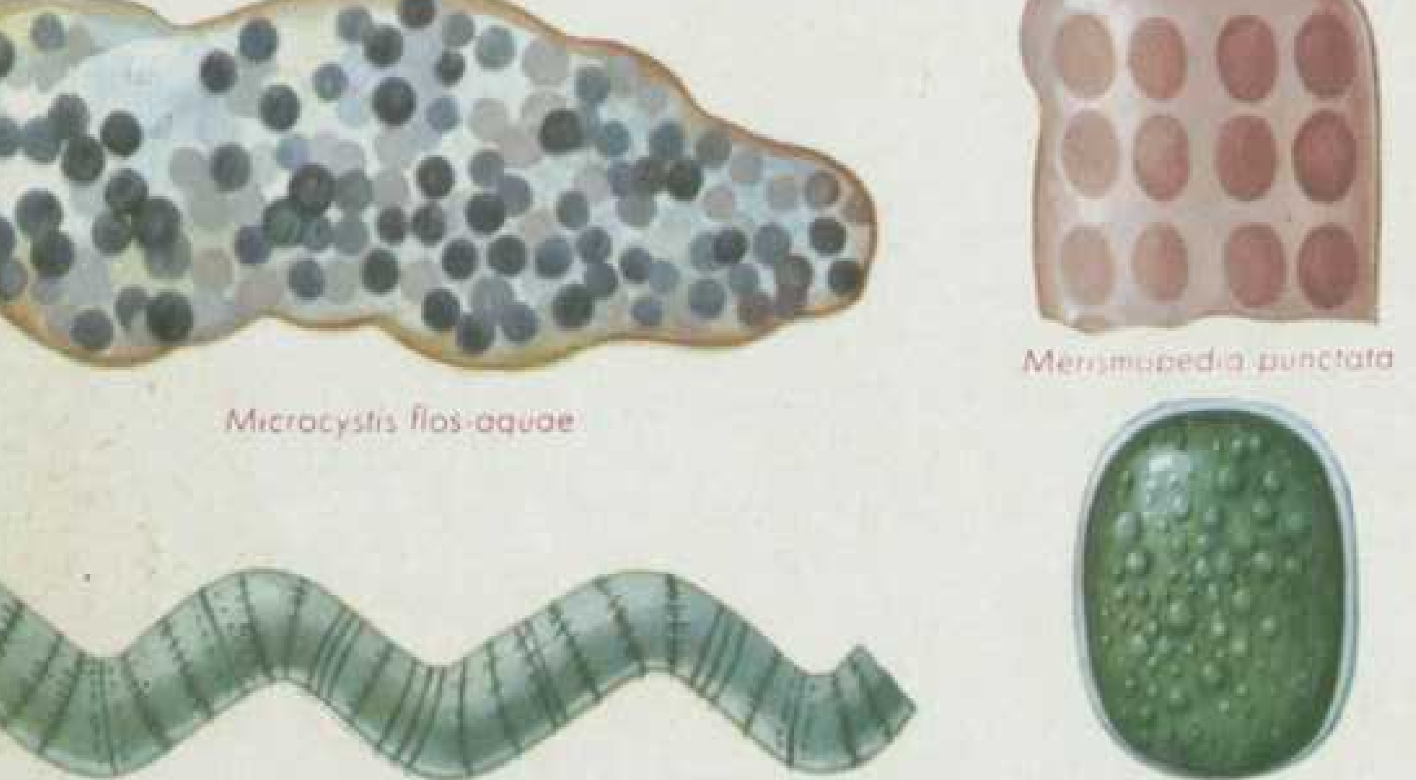


Fig. 1. — Algas microscópicas (Diatomeas, Conyugadas y Clorofíceas) acuáticas.



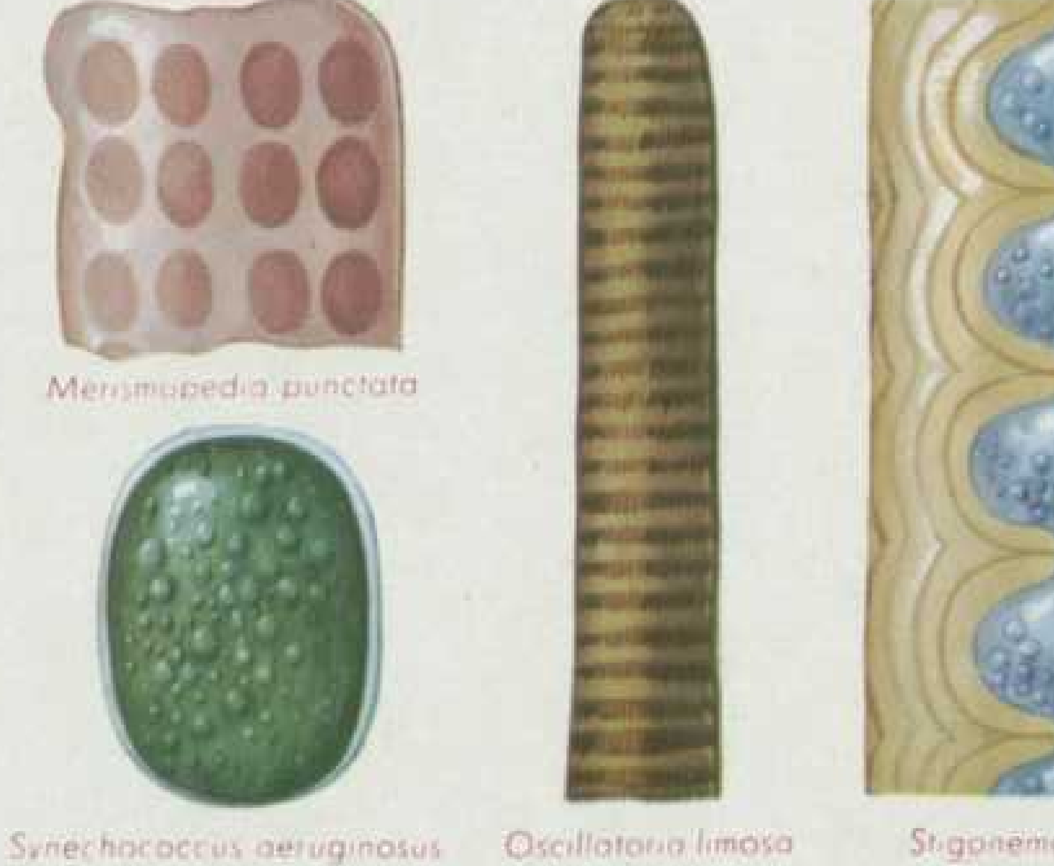


Fig. 2. — Algas unicelulares (Cianofíceas) acuáticas.

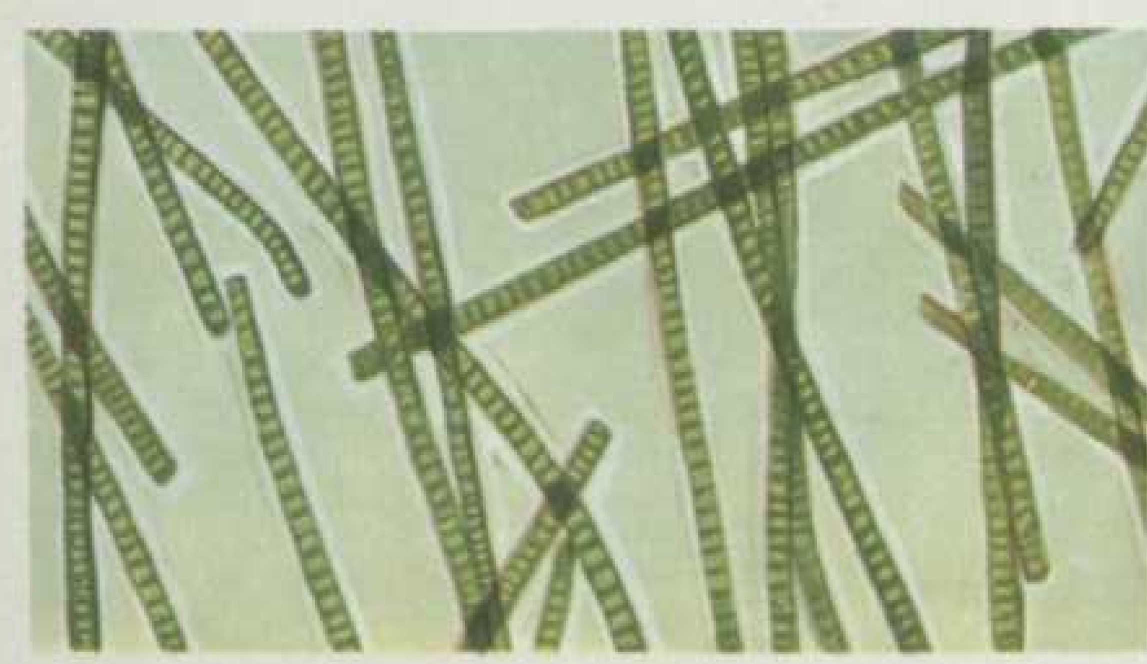


Fig. 3. — Aspecto de *Oscillatoria* (Cianofícea) que vive sobre tierra húmeda.

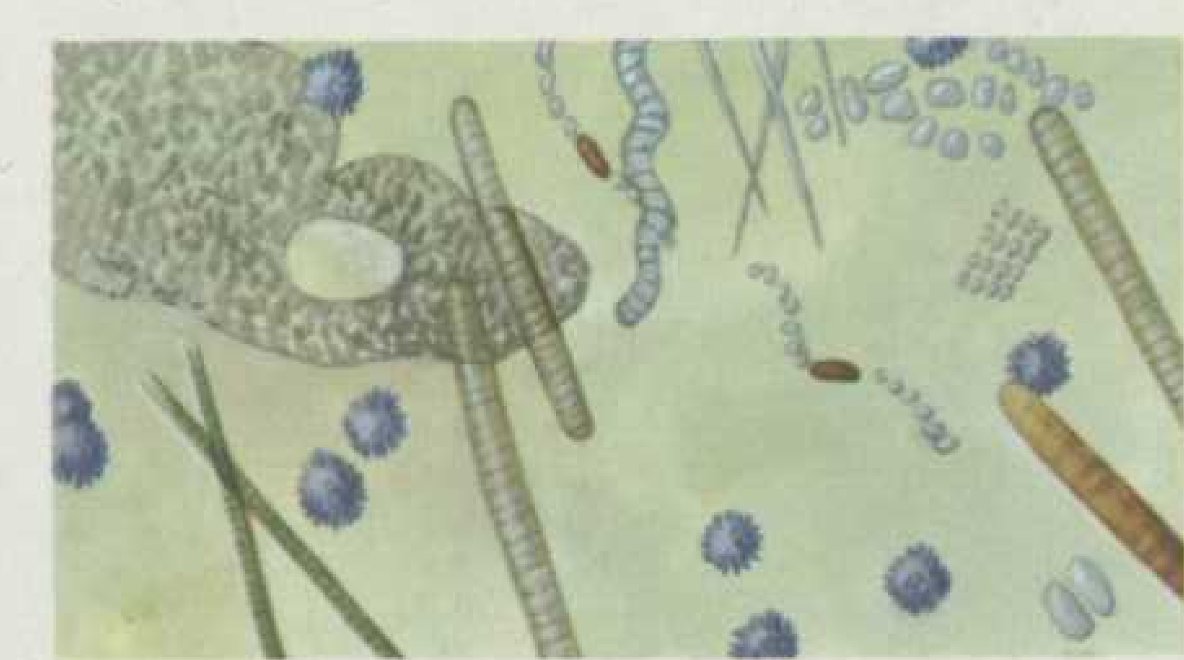


Fig. 4. — Algunas Cianofíceas más frecuentes que forman parte del plancton.

Clorofíceas

Comprenden todas las algas que poseen clorofila. Para simplificar, las dividiremos en:

a) *Clorofíceas unicelulares.* Células aisladas, pocas veces en colonias, muy excepcionalmente en filamentos.

b) *Clorofíceas filamentosas.* De largo variable, pluricelulares.

c) *Protococales.* Algas verdes unicelulares *(Tetraedron)* (lám. D/1, figura 1) o en colonias más o menos globulosas *(Gleocystis)* (lám. D/1, fig. 1). en serie lineal *(Scenedesmus)* (fig. 1) o planas *(Pediastrum)* (lám. D/1, fig. 1).

Recolección. Se encuentran en todas las aguas: plancton de estanques, lagos y fuentes, sobre los musgos, etc.

Método de observación. Se fijan por el formol o el líquido de Bouin, añadidos en la proporción del 10 o del 20 por 100 al líquido que las contenga. Para conservar el color verde se emplea el líquido cupro-acético.

Se pasan al líquido glicerinado y se montan en gelatina glicerinada. También se pueden montar en bálsamo del Canadá. La tinción con nigrosina permite ver fácilmente los apéndices.

Clorofíceas filamentosas

Algas verdes que forman filamentos de longitud variable. Pertenecen a varias Familias. Las más importantes de ellas son:

Microsporales: *Microspora.*
Ulotricales: *Ulothrix.*
Sifonales: *Vaucheria.*

Recolección. Estas algas son muy fáciles de encontrar y de recoger, pues son muy abundantes en la superficie y en el fondo de las aguas de ríos, lagos, estanques, pantanos, etc. Se pueden introducir en frascos de boca ancha con agua, a la que se adiciona líquido conservador en la proporción del 10 por 100.

Método de observación. La observación en fresco entre porta y cubre es la más sencilla, pues, por la fuerte coloración de estas algas, no es preciso hacer ninguna operación encaminada a hacerlas más visibles. Para conservarlas se procede igual que para las Desmidiáceas.

Un método muy apropiado y sencillo es el de fijarlas durante 24 horas en el líquido cromo-acético, lavarlas con agua durante otras 24 horas, teñirlas con hematoxilina al 0,5 por 100 durante 12 horas, lavarlas de nuevo con agua, pasarlas por glicerina al 10 por 100 en alcohol y dejarlas tres o cuatro días en este líquido. Transcurrido este tiempo se procede a montarlas en gelatina glicerinada.

Conyugadas

Las Conyugadas son algas verdes unicelulares, algunas veces filamentosas, que raramente forman colonias. Sus células se dividen en dos mitades simétricas marcadas por un estrangulamiento o cintura más o menos aparente. (Fig. 1.) Tienen cromatóforos de formas diversas con pirenoides.

Recolección. Se encuentran en aguas poco mineralizadas, oligotróficas, ácidas, y en turberas, estanques y pantanos en terrenos silíceos. Son muy raras en terrenos calcáreos.

Método de observación. Pueden observarse en vivo entre porta y cubre. Se conservan como las del grupo anterior. Para teñirlas debe seguirse el siguiente método: se fija la preparación con la mezcla cromo-acética, se lava abundantemente, se colorea con hematoxilina o, mejor, con hemalum-eosina, y se deshidrata y monta en el bálsamo de Canadá.

Heterocontas

Son algas muy parecidas a las Clorofíceas.

Su color es verdoso amarillento. (Figura 2.) No son tan abundantes como las Clorofíceas. Son unicelulares *(Characiopsis)*, se agrupan en colonias *(Botryococcus)* o son filamentosas *(Tribonema)*.

Recolección. Se encuentran junto a otras algas, sobre todo en aguas ácidas.

Métodos de observación. Los mismos que para las Clorofíceas.

Rodofíceas y Feofíceas

Se distinguen por tener en sus cromatóforos pigmentos rojizos o pardos. Son algas filamentosas. (Figs. 3 y 4.)

Recolección. Habitan en aguas corrientes, donde forman masas de color marrón bien visibles.

Métodos de observación. Se emplean los mismos que para las anteriores. Los *Batrachospermum* se fijan en líquido cromo-acético, se colorean con hematoxilina, se disocian con una aguja y se montan en glicerina.



ALGAS

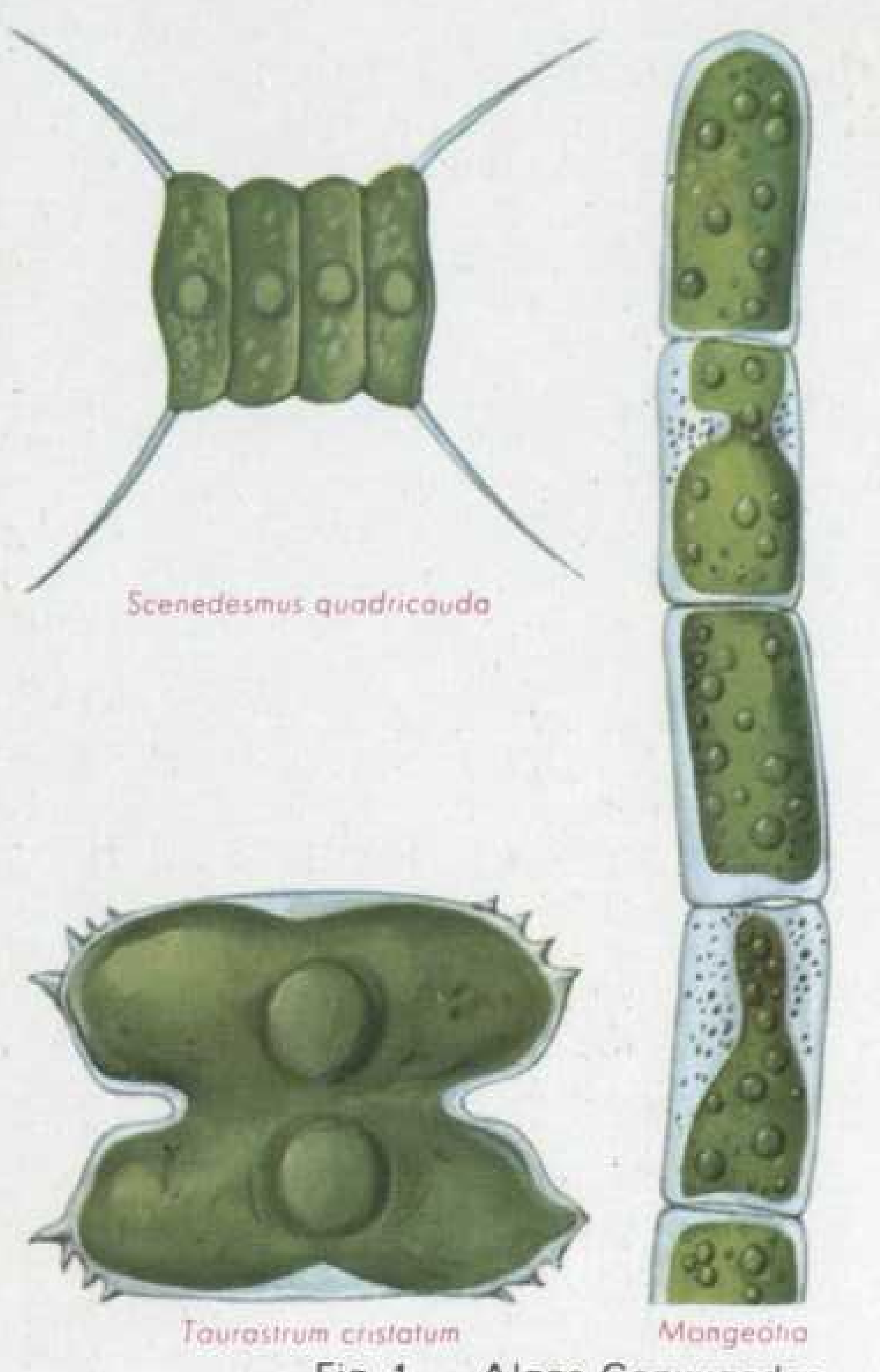


Fig. 1. — Algas Conyugadas.

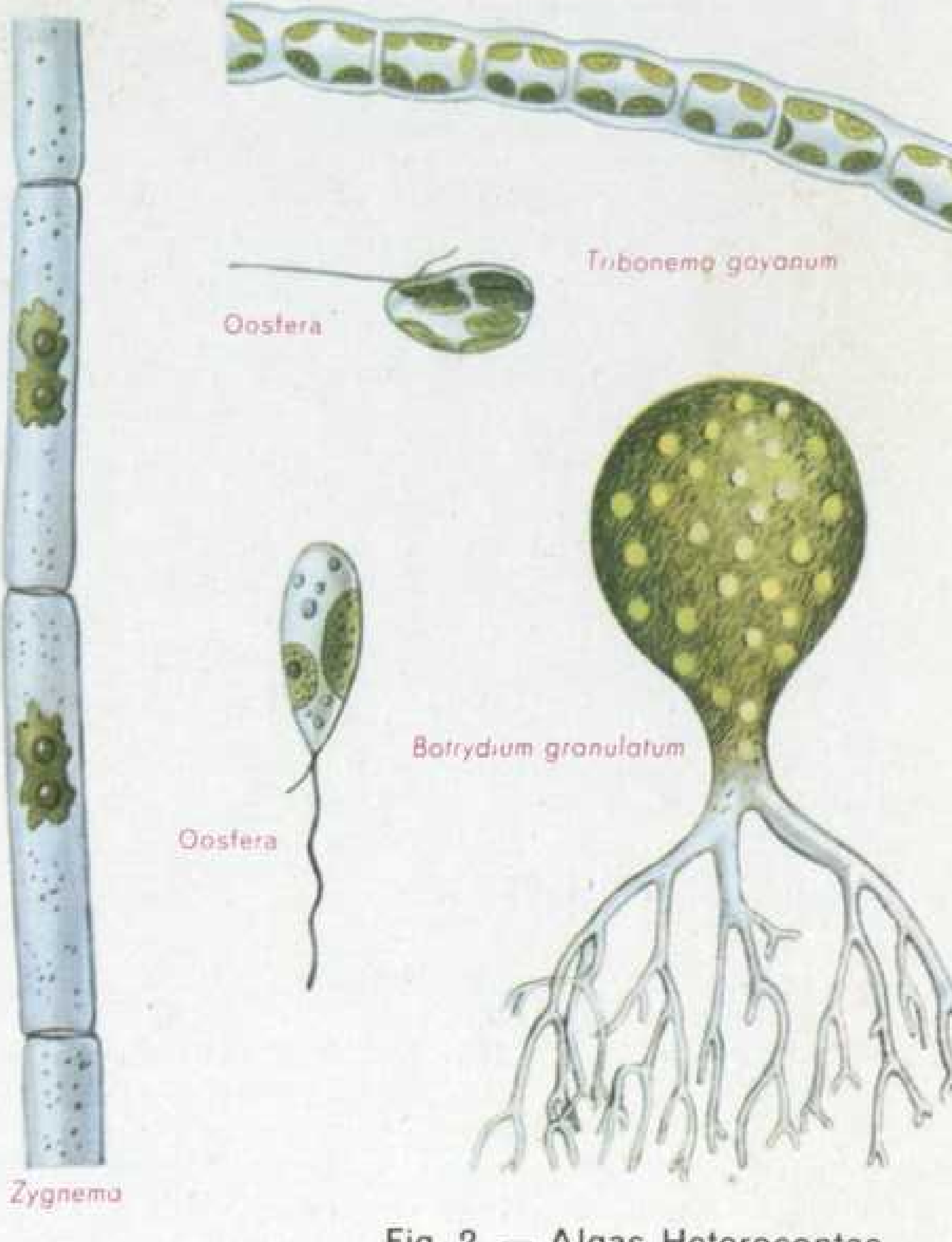


Fig. 2. — Algas Heterocontas.



Fig. 3. — Algas rojas o Rodofíceas.





Fig. 4. — Un alga parda o Feofícea: el *Fucus vesiculosus.*

Diatomeas

Son algas microscópicas unicelulares, provistas de cromatóforos de color marrón dorado. Su cuerpo es protoplasmático con núcleo y cromatóforos envueltos por un caparazón silíceo que consta de dos valvas, como una caja, y denominado frústulo.

Su distribución es tan extensa que solamente la de las bacterias la supera. Están presentes en todos los mares (figura 2); en las aguas dulces (fig. 1), frías o cálidas, en la tierra, en los musgos, en los lugares húmedos, etc. Un poco de luz es suficiente para que se desarrollen. En tiempos pasados fue tal su abundancia en los mares, que hay rocas formadas totalmente por Diatomeas fósiles (diatomita, tierra de Trípoli, de un espesor de varios centenares de metros). Provienen de depósitos marinos. El estudio microscópico de estos depósitos fósiles tiene mucha importancia desde el punto de vista paleontológico. En G/1, sobre «Micropaleontología», se exponen sus métodos de estudio. Se clasifican en:

1.º *Céntricas.* Frústulo más o menos cilíndrico y ornamentación radiada, simétrica para con un punto central.

2.º *Pennales.* Frústulo no cilíndrico, con simetría axial. A todo lo largo de la Diatomea se observa la rafe.

Recolección. En las aguas dulces se aplican los métodos generales. Se visitan todas las estaciones: aguas estancadas, aguas corrientes, riachuelos, lagos, pantanos, etc., donde forman a veces un sedimento pardusco que se reconoce fácilmente luego de observado una vez. Algunas especies forman filamentos más o menos largos adosados a las piedras y objetos sumergidos. Con una red de nilón muy fina es factible recoger Diatomeas del plancton de lagos y estanques. En el mar se pueden recoger con redes finas Diatomeas planctónicas, que son muy numerosas. Otras viven epífitas en las algas verdes y pardas.

Métodos de observación. Para el estudio del plasma, del núcleo, de los cromatóforos, etc., se aplican los métodos generales: se fijan en Bouin, se tiñen con hematoxilina férrica y se montan en bálsamo, pero para estudiar sus frústulos con todo detalle a efectos de clasificación, son precisos métodos destinados a eliminar por completo la materia orgánica y dejar el frústulo completamente limpio.

Método de los ácidos fuertes. Se pone la muestra en un pocillo de porcelana y se recubre con ácido nítrico. Se calienta suavemente bajo una campana y se añade ácido a medida que se va evaporando el anterior. Se separa de la llama y se añade agua destilada; se decanta y se añade de nuevo agua hasta la total desaparición del ácido nítrico. El sedimento húmedo obtenido se trata con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y ácido crómico cristalizado, que se calienta con mucha prudencia hasta que se desprende vapor. Se saca del fuego y se deja actuar durante dos o tres días. Transcurrido este tiempo, se vierte todo el contenido en agua destilada y se dejan sedimentar las Diatomeas. Se decantan y se llena el pocillo de agua; esta operación se repite hasta que desaparece el ácido sulfúrico. Se recoge el sedimento y se monta en bálsamo. Como este método es demasiado fuerte para determinadas Diatomeas planctónicas, puede emplearse el

Método del agua de Javel. Es el líquido que resulta de mezclar cloro con hidróxido sódico, mezcla que forma cloruro e hipoclorito sódico.

Se cubre la muestra con agua de Javel, que se cambia varias veces y se deja actuar corrientemente unas 24 horas. Se lava y decanta.

Por uno u otro método se obtiene finalmente un depósito blanco grisáceo constituido por frústulos de Diatomeas de todas dimensiones. Tamizando éstas con cedazos de mallas finas de diferente paso se logra clasificarlos por tamaños. Se deshidrata una parte de esta masa, pasándola sucesivamente por alcohol, desde 70º a 90º y absoluto, y por xilol, y se monta en bálsamo. El resto de la masa puede guardarse en tubo de ensayo, cerrado y etiquetado para sucesivas preparaciones.

Los detalles de ornamentación del frústulo de algunos Diatomeas sirven de «test» para comprobar (fig. 3) el poder resolutivo de los microscopios.

Distribución de las algas marinas

Su distribución varía con la naturaleza del pigmento que contienen. En la superficie viven todos los grupos.

A partir de los 30 metros de profundidad ya no hay algas verdes ni azules. A 100 metros, no las hay pardas. Y a 300 metros tampoco rojas, por carencia de luz.

Recolección. Se encuentran en primavera y en otoño, durante las mareas bajas, sobre las rocas.

Conservación. En alcohol de 90º o en una solución pícrica; nunca en formol.

Método de observación. Se fijan en ácido pícrico saturado o en solución de quinona al 2 ó al 4 por 100. Se montan en lactofenol o en gelatina glicerinada. Se colorean con fucsina, calentándolas ligeramente.

DIATOMEAS

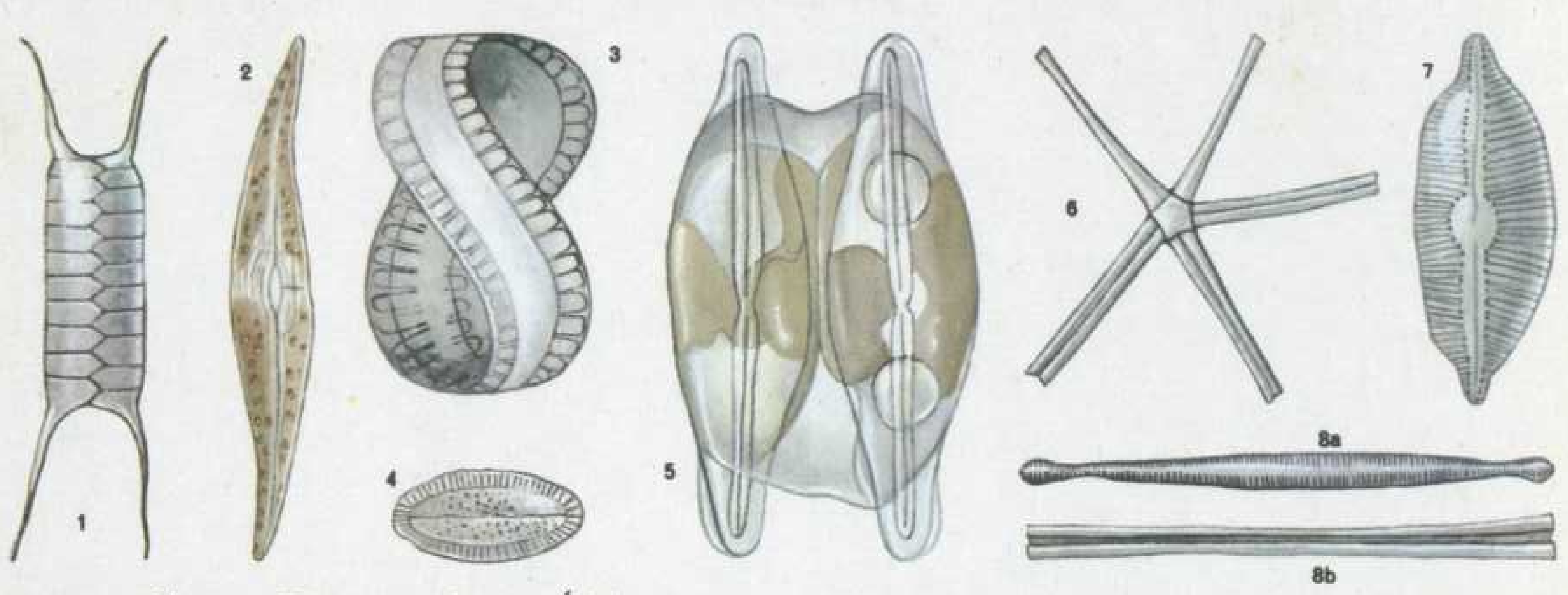


Fig. 1. — Algunas Diatomeas de agua dulce. 1, *Attheya zachariasi,* 2, *Cyrosigma attenuatum,* 3, *Surirella spiralis;* 4, *Cocconeis placentula;* 5, copulación de dos Diatomeas; 6, *Asterionella gracillima;* 7, *Cymbella cuspidata,* y 8, *Synedra ulna,* en a, vista por su cara valvar; en b, por su cara conectiva.

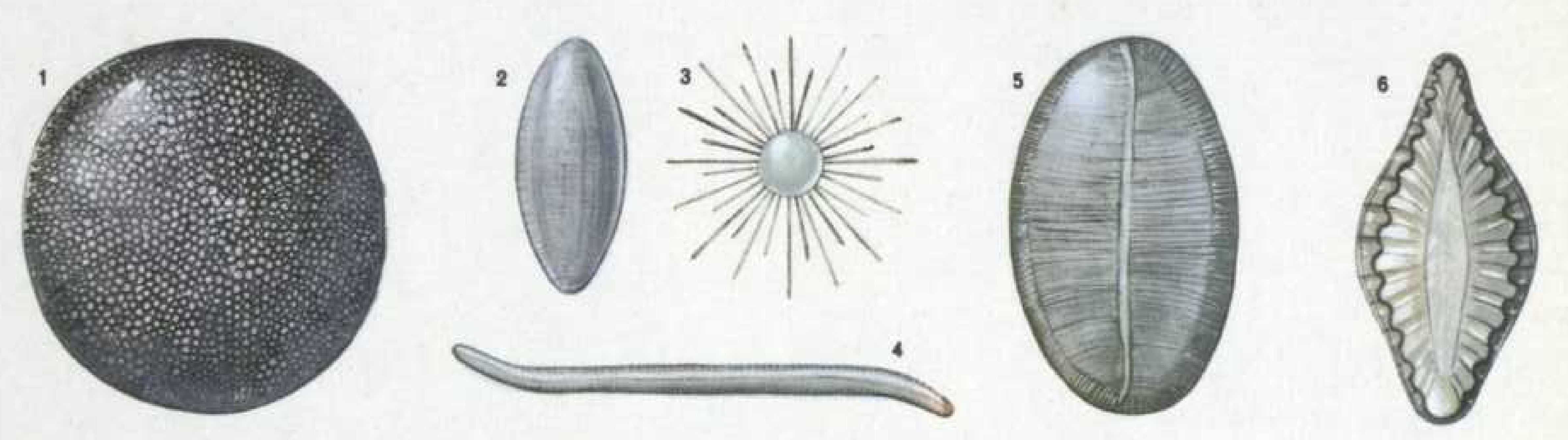


Fig. 2. — Algunas Diatomeas marinas. 1, *Coscinodiscus oculus-iridis;* 2, *Nitzschia granulata;* 3, *Corethron hystrix;* 4, *Surirella elongata;* 5, *Nitzschia trybionella,* y 6, *Surirella turgida.*

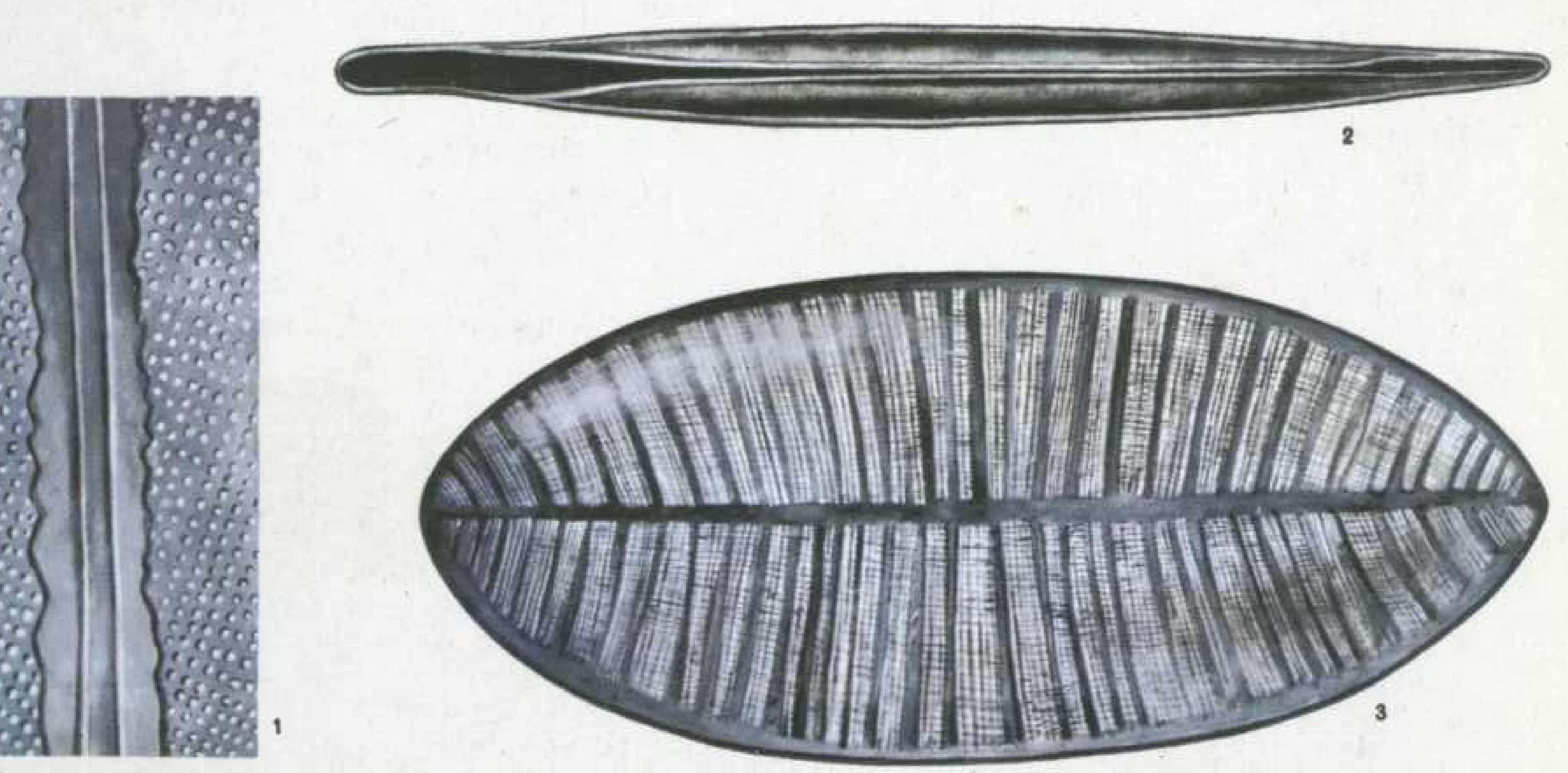


Fig. 3. — Diatomeas empleadas como "tests". 1, *Pleurosigma angulatum,* fragmento de la valva; 2, *Amphipleura pellucida,* y 3, *Surirella gemma.*

MICOLOGÍA

Técnica de observación

Hongos libres. Se dilaceran en unas gotas de lactofenol o bien en lactofenol con azul de cotón (lactofenol 100, azul de cotón 0,5). Se montan en lactofenol o en gelatina glicerinada.

Hongos parásitos. Se hacen cortes de órganos parasitados (fig. 1) con el micrótomo, y se procede como para los anteriores.

Las esporas pueden montarse en lactofenol y observarse en gota pendiente. (Figuras 2 y 3 A.)

Preparación de mohos

Se toma con una pinza una porción de crecimiento reciente, procurando cogerla por la base, y se deposita encima de un portaobjetos, al lado de una gota de alcohol amoniacal; se provoca el contacto: el alcohol mojará las hifas, y así, los líquidos empleados después, penetrarán en los tejidos.

Se deja actuar el líquido de Fleming.

Líquido de Fleming:

Acido ósmico al 2 %	. . .	4 ml.
Acido crómico al 1 %	. .	15 »
Acido acético	. . . . . .	1 »

Se lava la preparación con agua, se reemplaza el agua por glicerina y se monta en gelatina glicerinada.

LEVADURAS

Las levaduras se encuentran en líquidos azucarados y en frutas en fermentación. Son muy abundantes en la Naturaleza. Industrialmente, son fáciles de obtener las levaduras de cerveza *(Saccharomyces cerevisiae)* y la levadura del vino *(Saccharomyces ellipsoideus)*, de uso corriente. (Fig. 4.)

Técnica de observación. Se recogerán las levaduras en los medios de cultivo: líquidos azucarados, mostos, etcétera, con una pipeta o con el asa de platino, y se pondrán una o dos gotas en un porta.

Se hace un frotis y se fija por calor o en alcohol de 96°. Puede fijarse también en sublimado, aunque es recomendable hacerlo en una solución de ácido pícrico saturado.

Se colorea con hematoxilina, eosina o por el método del azul policromo, según la siguiente técnica:

1.° Se colorea durante 15 minutos ó 12 horas, según los casos, con azul policromo puro.
2.° Se lava abundantemente para eliminar el exceso de colorante.
3.° Se diferencia por medio de éter glicérico.
4.° Se lava durante largo tiempo con agua corriente.
5.° Se deshidrata con alcohol absoluto y se seca.
6.° Se observa con objetivo de inmersión en aceite de cedro.

TIÑAS

Son Gimnoascáceas. Se les llama tiñas, favus, tricofíticos, etc. Son parásitos que producen enfermedades en la piel y atacan los pelos, los cabellos y la epidermis. (Figs. 5-8.)

Técnica de observación. Los objetos parasitados (cabellos, fragmentos de epidermis) se sumergen en una solución de potasa al 40 por 100 y se calientan suavemente hasta llegar a la ebullición. La sustancia propia del cabello o de la epidermis se aclara, conservándose, no obstante, sin menoscabo los filamentos y las esporas del hongo.

Se montan en la misma solución de potasa.

También podemos utilizar, en lugar de potasa, una solución de clorofenol solo o clorofenol salicílico (al 10 por 100); se calienta la preparación y se monta en goma tragacanto. Se diafragma para la observación.

Las descamaciones se aclaran en una solución acuosa de potasa cáustica al 10 por 100. Se lavan con agua. Se prepara:

Líquido de Giemsa .	2 a 3 partes
Glicerina	3 a 10 »

Se colorea la preparación con una o dos gotas de esta mezcla.

El epitelio cornificado queda coloreado en rosa; el micelio y las esporas, en azul oscuro.

Los cortes de tejidos fijados en alcohol o los frotis secados al aire y fijados en alcohol de 70° se tiñen durante diez o doce horas con el colorante Giemsa-glicerina; se deshidratan con acetona, se aclaran con xilol y se montan en aceite de cedro.

Los hongos y microorganismos quedan coloreados en rojo.

DERMATOMICOSIS

Las producen unos hongos parásitos que provocan descamaciones y erupciones en la piel. Para observar el hongo causante de estas lesiones se toma con unas pinzas una descamación y se pone en el centro de una gota de ácido acético glacial, encima de un porta, disociándola con la ayuda de una aguja. Se deja secar. Se fija con alcohol absoluto. Se colorea, calentándola, con azul de tolidina al 1 por 100. Se diferencia con esencia de girasol. Se tiñe el fondo con eosina. El micelio parasito queda teñido en azul violáceo; el fondo, en rosa claro

MICOLOGIA



Fig. 1. — Hoja de rosal con hongos parásitos (*Phragmidium subcorticium*).

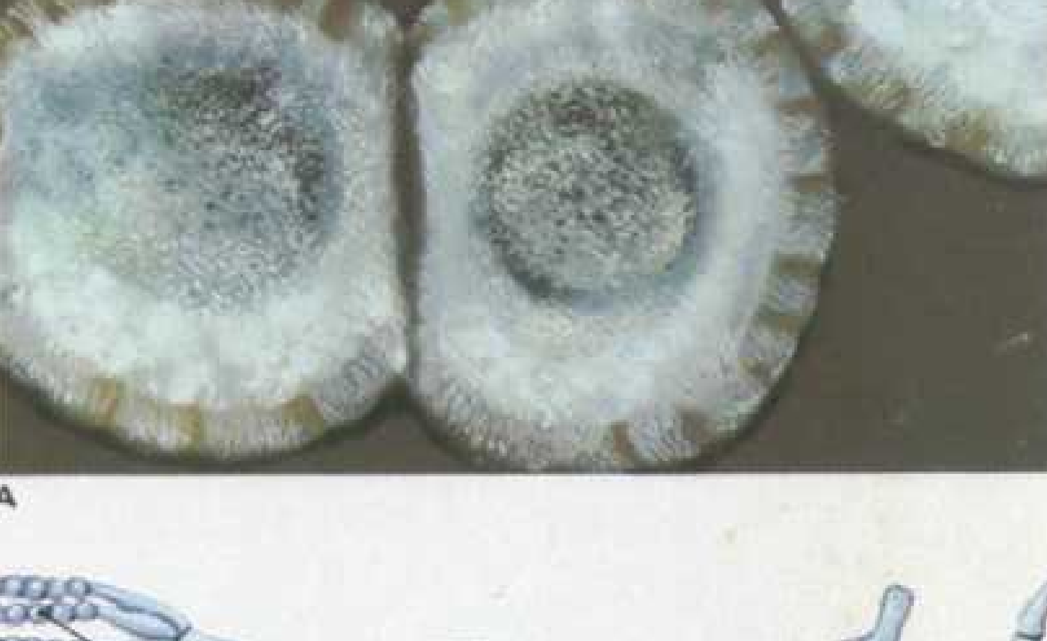


Fig. 3. — Peritecios A e hifas B de *Penicillium* sp.

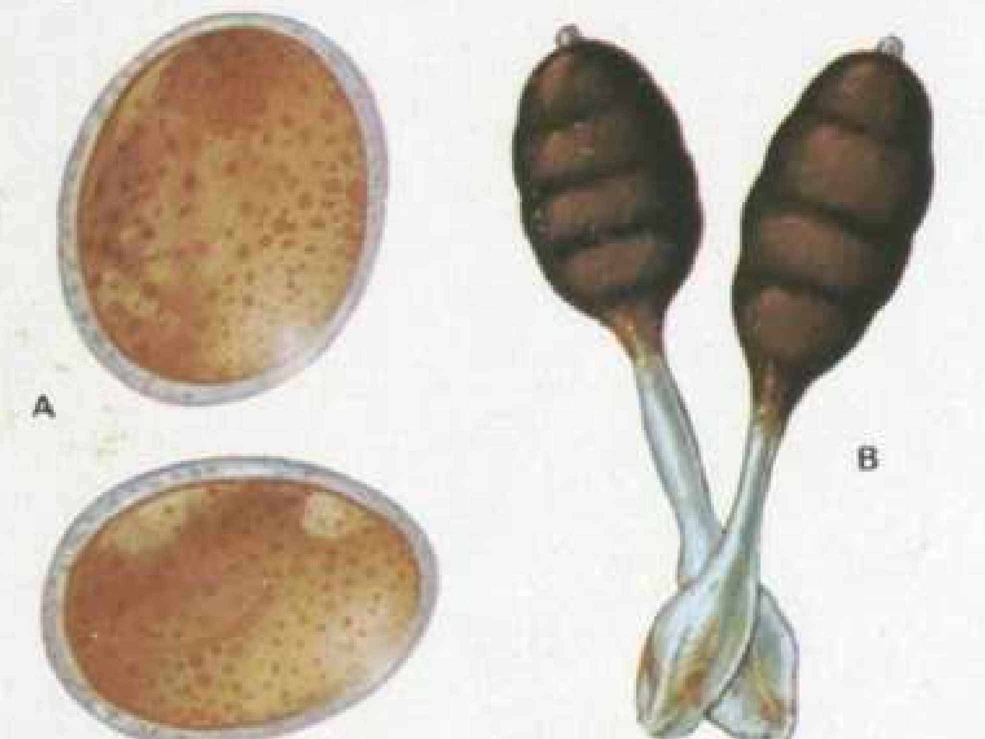


Fig. 2. — Uredósporas A y teliósporas B, de *Phragmidium subcorticium*

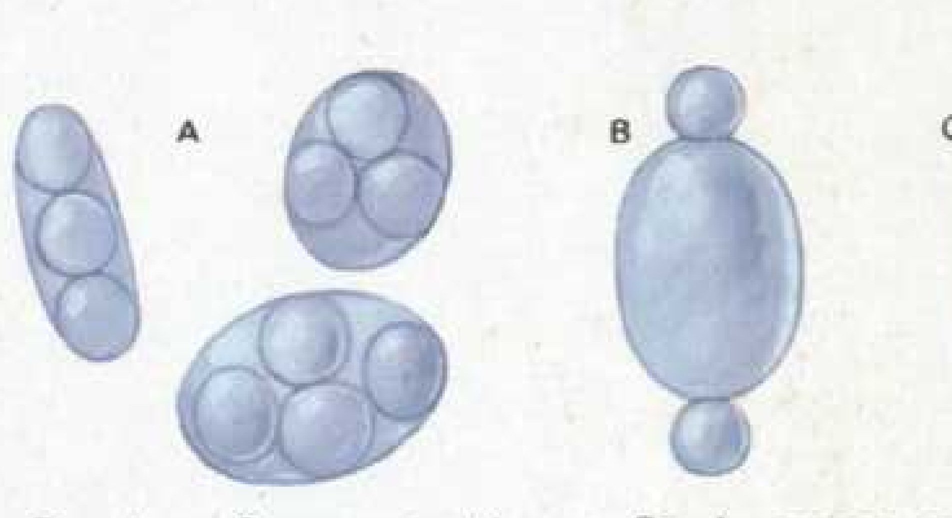


Fig. 4. — Sacaromicetáceas. En A, ascos con ascósporas; en B y C, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. ellipsoideus*



Fig. 5. — *Actinomyces bovis*, sin tinción y teñido por el Gram.

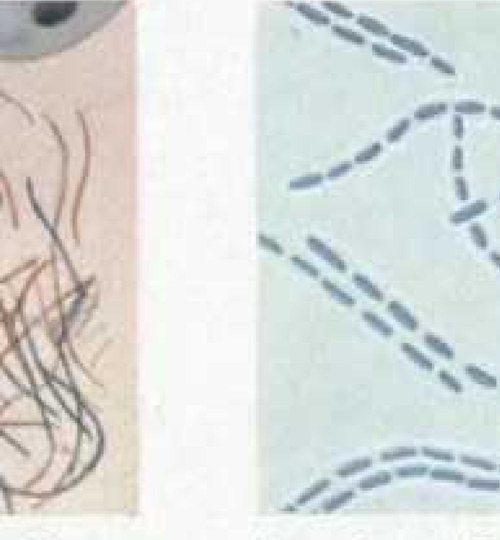


Fig. 6. — Esporidios de Ustilaginales teñidos por la tionina.

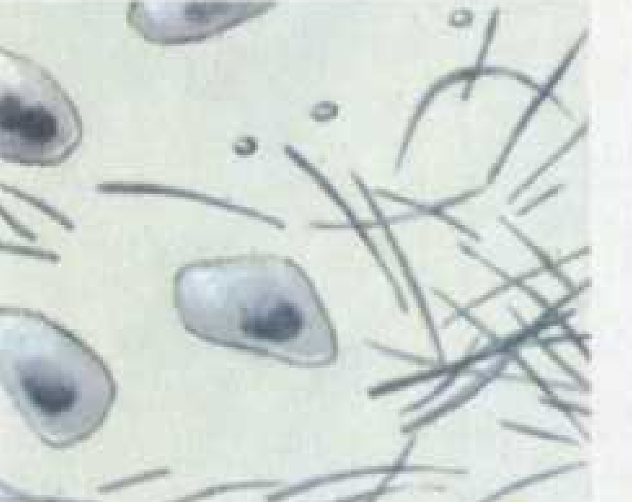


Fig. 7. — *Aspergillus* teñido por la tionina (× 300) y sin teñir (× 800).

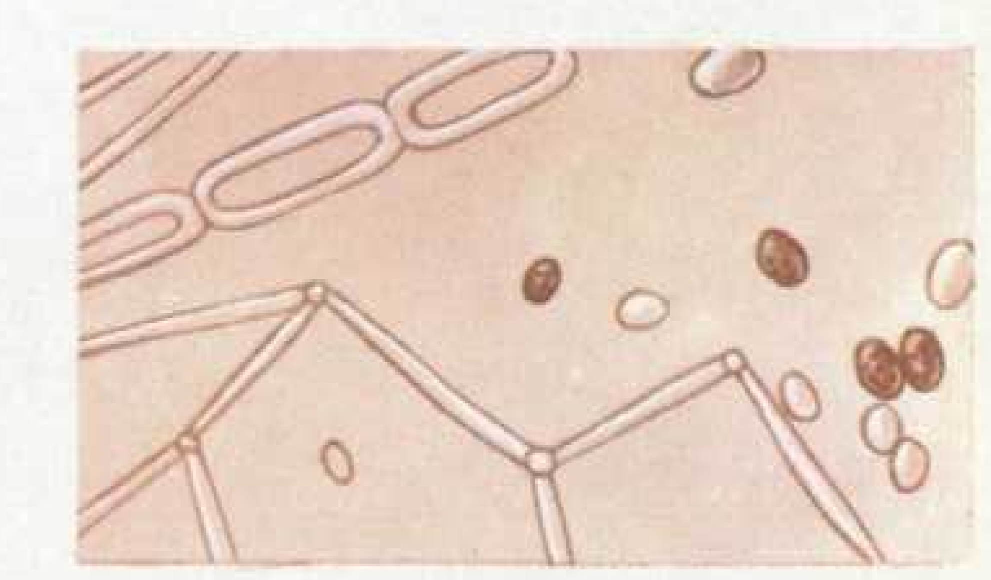


Fig. 8. — *Pitiviosis* teñido por la eosina.

EQUISETINEAS, FILICINAS Y BRIÓFITAS

Son plantas terrestres de color verde que se reproducen por fecundación de los arquegonios, produciendo embriones que, según los grupos, se desarrollan posteriormente de muy diferente manera, dando lugar a alternancia de generaciones.

Las Equisetíneas y las Filicinas son dos Clases del grupo de las Arquegoniadas. Los equisetos (fig. 1), o «cola de caballo» viven en parajes húmedos y de suelo arenoso de las zonas templadas y subtropicales. Las Filicinas o helechos (fig. 2) cubren grandes extensiones del sotobosque de las regiones templadas y subtropicales. Las Briófitas comprenden dos Clases perfectamente distintas: Hepáticas y Musgos. Tanto las Hepáticas como los Musgos (figuras 3 y 4) se encuentran, principalmente en otoño, en los lugares húmedos después de períodos lluviosos.

El estudio se hace en fresco, montando las muestras en una gota de agua o de glicerina, o bien, en el caso de que deseemos conservarlas, en gelatina glicerinada o en bálsamo del Canadá.

Las especies o muestras muy espesas se aclaran con agua de Javel durante cuatro o cinco minutos. Para aclarar briófitas se emplea agua de Javel en lugar de potasa, pues ésta disocia demasiado los tejidos.

Se lavan con abundante agua corriente.

Se tiñen durante cinco minutos con una solución de verde yodo. Se lavan, y se observan sirviéndose de un objetivo débil.

Se emplea mucho, para montar Musgos, Hepáticas, hojas, polen, esporangios, esporas de helechos y otras epidermis vegetales, el siguiente líquido:

Agua	10 ml.
Goma arábiga	10 gr.
Glucosa	5 »

A él se añaden unos granitos de timol.

Las esporas pueden montarse en aceite de vaselina, en parafina o bien en bálsamo del Canadá muy diluido.

(Viene de la lámina B/7)

Azul de metileno

Se emplea en solución hidroalcohólica, alcohólica o acuosa. Es útil para la coloración de fondo, la de protozoos y las coloraciones dobles. Actúa con sólo unos minutos. (Fig. 5.) Si se produce sobrecoloración, la preparación se lava con agua o alcohol.

Safranina.

Se emplea en solución alcohólica:

Safranina	1 gr.
Alcohol de 90° . . .	100 »

Se disuelve y se añade:

Agua destilada . . .	100 ml.
Formol	2 gr.

Es un colorante bastante rápido; sólo se necesita de unos minutos a una hora. Tiñe en rojo.

Colorantes ácidos

Se les llama también colorantes plasmáticos. Los más corrientes son:

Fucsina ácida

Se utiliza en cortes vegetales. Actúa como fijador y colorante. Es poco estable. Se emplea en solución acuosa al 1/500 ó al 1/1.000. El lavado con agua decolora rápidamente las preparaciones teñidas con este colorante.

Eosina

Es el más utilizado de los colorantes plasmáticos. (Fig. 4.) Se emplea en solución acuosa al 1 por 100.

Acido pícrico

En solución acuosa saturada colorea el plasma en amarillo. (Fig. 6.) Se emplea antes del carmín (picrocarmín) o también con él.

EQUISETINEAS Y FILICINAS

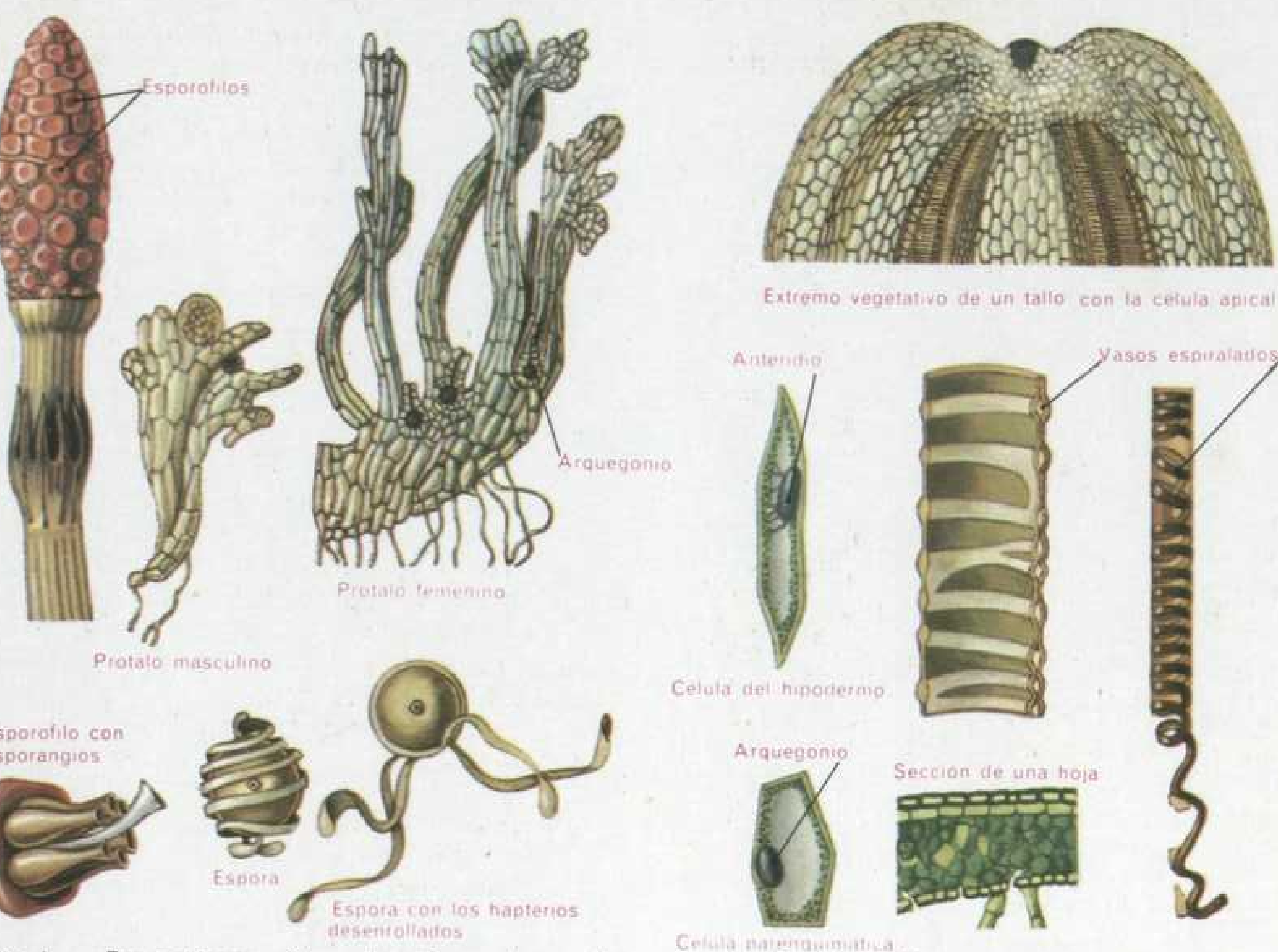


Fig. 1. — Equisetíneas. Reproducción y desarrollo del [illegible]

Fig. 2. — Histología de las Filicinas o Helechos.

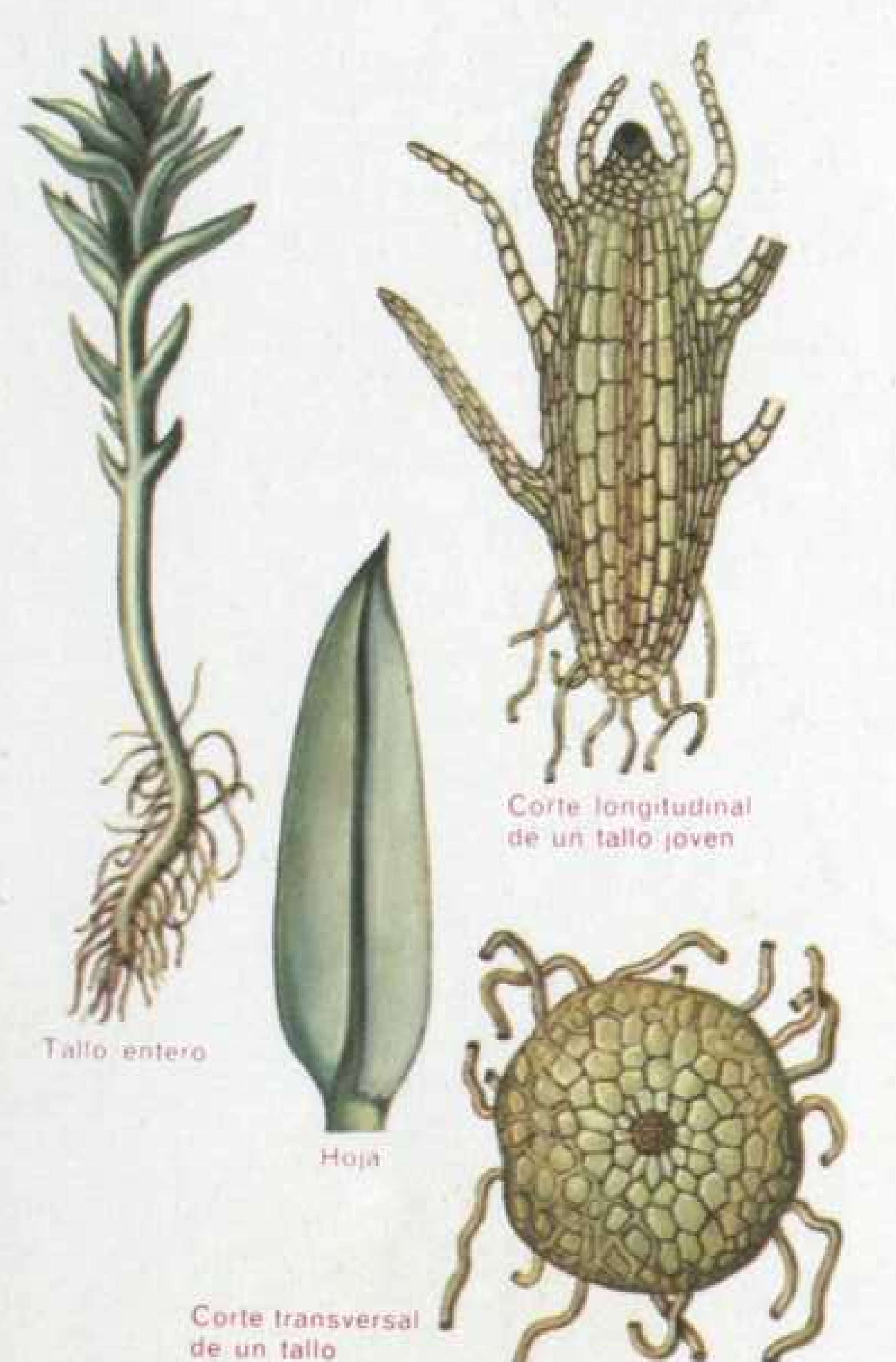


Fig. 3. — Morfología e histología de las Briofitas (Musgos).



Fig. 4. — Reproducción y desarrollo de un Musgo

ARQUEGONIADAS Y EMBRIÓFITAS

Son los vegetales más conocidos: hierbas, arbustos, árboles. Están constituidos por raíces, tallo, hojas (fig. 5), polen (figs. 1, 2), semillas (fig. 3), pelos (fig. 4), etc.

Su estudio microscópico nos muestra sus elementos constituyentes: las células, que forman tejidos; vasos, estomas (fig. 5), fibras de sostén (líber, leño, cámbium) (lám. D/7, fig. 1), así como sus elementos de síntesis: almidón, esencias contenidas en glándulas y otras inclusiones protoplasmáticas.

A causa de su tamaño han de observarse en pequeñas porciones, que se obtienen realizando cortes, los cuales se disocian y tiñen según veremos al estudiar los métodos de observación.

Siempre que sea posible se hará su estudio en fresco. De no poder hacerlo así, se conservarán las muestras en alcohol de 70º, en formol al 2 ó 3 por 100, o en una mezcla a partes iguales de agua, glicerina y alcohol. Las porciones destinadas al estudio citológico o histológico se fijarán en alcohol absoluto o en la mezcla siguiente:

Alcohol	96 ml.
Formol	2 »
Acido acético	2 »

Se pueden emplear también los líquidos de Bouin o de Fleming.

Una vez fijadas, las muestras se conservan en alcohol de 70º o se montan en parafina.

El líquido de Bouin cúprico conserva indefinidamente el color verde de las hojas. Se prepara añadiendo un 1 por 100 de sulfato de cobre al líquido de Bouin.

Aclarado

Los cortes destinados a los estudios anatómicos se aclararán por medio de una solución de hipoclorito sódico o potásico (nunca con agua de Javel), a la que se dejará actuar durante unos minutos, en frío o en caliente, según el grosor de la muestra que se va a estudiar. La acción del hipoclorito no debe exceder de varios minutos, especialmente en los tejidos tiernos. Se lavan los cortes con agua acidulada con acético, o con bisulfito sódico diluido, y se secan.

Ciertos tejidos requieren el empleo de soluciones alcohólicas de sodio o potasio.

Colorantes

Para estudiarlos, el protoplasma y el núcleo de las células vegetales se teñirán con colorantes nucleares y plasmáticos y con coloraciones combinadas. Los colorantes nucleares pueden ser progresivos o regresivos; los progresivos (verde de metilo, vesubina, etc.) tiñen ciertos elementos celulares, y su acción puede detenerse por lavado con agua, quedando teñidos sólo algunos de ellos. Los regresivos (azul policromo, fucsina, safranina, violeta de genciana) colorean todos los elementos de la célula, que pueden ser decolorados por ciertas manipulaciones, de modo que sólo quedan coloreadas aquellas partes que presentan afinidad para el colorante.

Los colorantes plasmáticos (azul de metileno, eosina, fucsina ácida, verde brillante) se emplean combinados con los colorantes nucleares y se hacen actuar durante 10 ó 20 minutos.

La preparación se lava y se deshidrata. En cuanto al montaje, se efectúa en resina o bien en bálsamo.

(Viene de la lámina G/1)

montar en bálsamo del Canadá. La mayoría de los Flagelados pueden observarse con objetivos de mediano aumento; sin embargo, para buscar Ebriáceos y Crisomonadinos son necesarios objetivos de inmersión.

Algunos microfósiles pueden colorearse de la siguiente manera: se pone una gota de solución concentrada de colorante (fucsina, azul de metileno, violeta de genciana) y se deja actuar durante 24 horas. Se lavan con agua o alcohol, se secan, se pone una gota de aceite y se observan.

Una vez secos, los fósiles quedarán pegados al porta por la gelatina insolubilizada mediante el formol; entonces puede teñirse el frotis o tratarse como otra preparación cualquiera.

MICROFÓSILES DIVERSOS

Técnica. Para las espículas silíceas se emplean, en general, los mismos métodos que para los microfósiles silíceos. Las espículas calcáreas se disgregan, lavan y tamizan. Con los Ostrácodos se sigue la misma técnica que para los Foraminíferos. En los conodontes, se observa en las secciones finas. Las mandíbulas de Gusanos se extraen por lavado y se tamizan.

Todas estas muestras pueden montarse en bálsamo y observarse con objetivos medianos. (Fig. 5.)

ARQUEGONIADAS Y EMBRIOFITAS

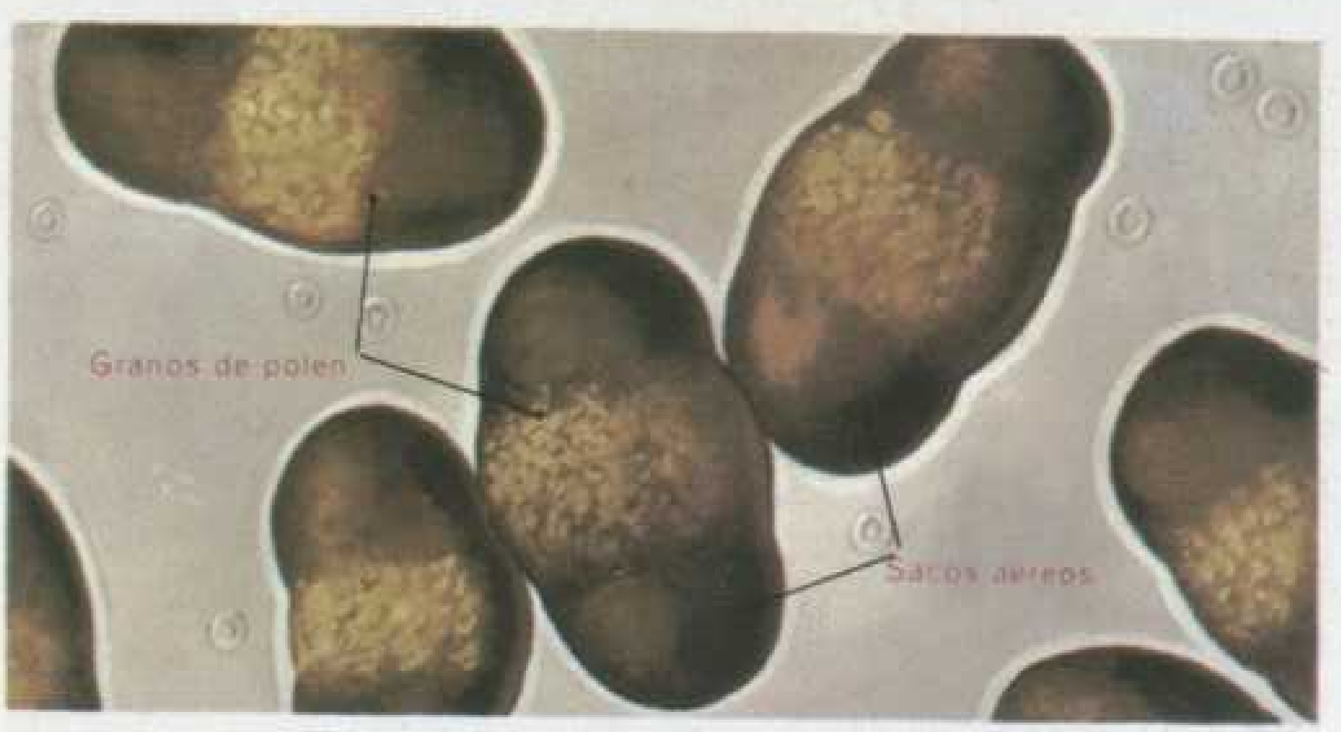


Fig. 1. — Varios granos de polen del pino *(Pinus pinnea)*



Fig. 2. — Antera del clavel con sus tecas abiertas lanzando granos de polen.



Fig. 3. — Grano (cariopsis) de trigo, aumentado 11 veces.

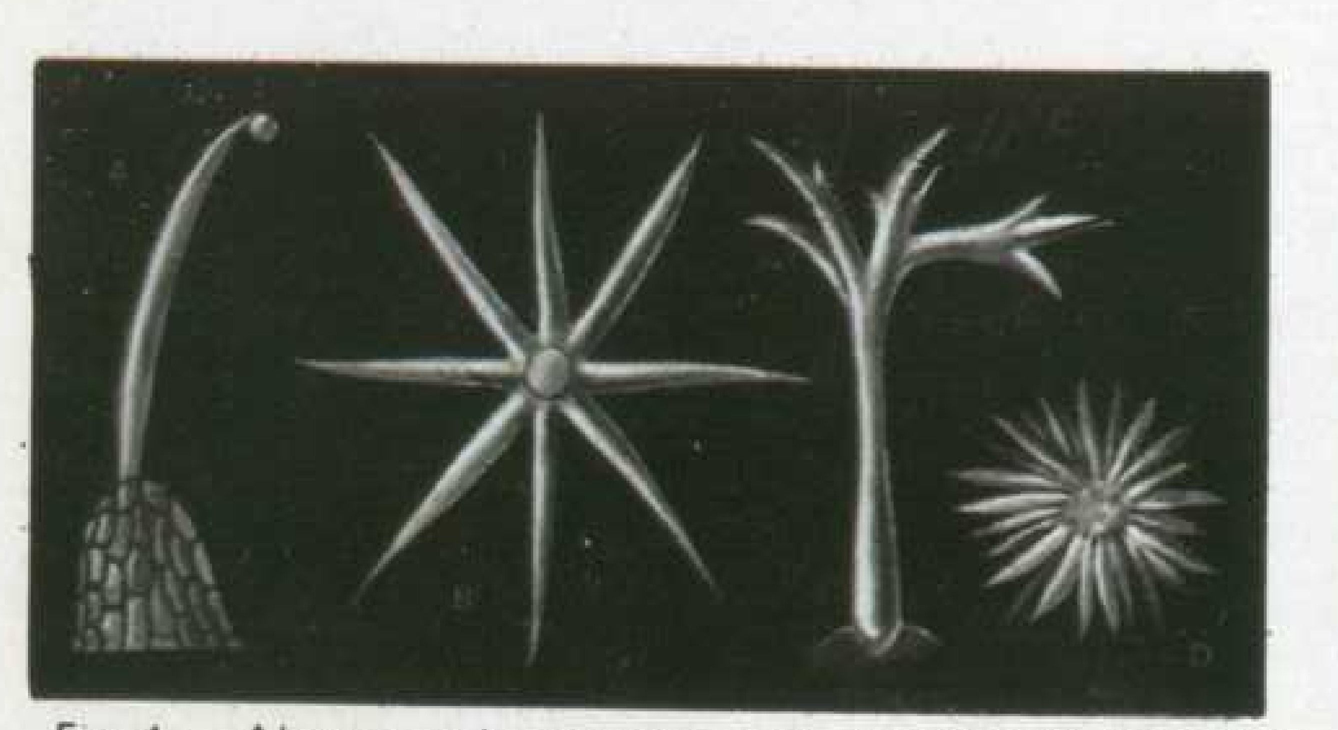

Fig. 4. — Algunos pelos vegetales: A, de ortiga; B, de malvarrosa; C, de lavanda, y D, de *Alyssum*.


Fig. 5. — Estomas en el envés de una hoja de la orquídea *Ophrys*

Colorantes combinados. Las coloraciones combinadas reúnen los colorantes nucleares y los plasmáticos (fig. 1, derecha e izquierda). Se utilizan muchas combinaciones, por jemplo: azul policromo-tanino orange; safranina-violeta de genciana-orange G; safranina-azul de metileno; safranina-verde brillante; safranina-hemalum; verde malaquita-rojo Congo; etc.

Colorantes vitales. Es más fácil la observación de elementos vivos en los vegetales que en los animales. (Figuras 2 y 3.)

Ciertos vegetales (tulipanes, iris) presentan grandes células epidérmicas y estomas que pueden observarse, con coloración o sin ella, entre porta y cubre.

Los colorantes vitales son básicos y de escasa toxicidad: rojo neutro, azul de cresol o azul de metileno. El rojo neutro se emplea en concentraciones al 1 por 1.000, por 5.000 o por 10.000; el azul de cresol, al 1 por 1.000, y el azul de metileno, al 1 por 100.000.

DISOCIACIÓN DE TEJIDOS

La disociación puede efectuarse por medios mecánicos o bien por medios químicos.

Si se emplean medios mecánicos, se opera con una aguja o lanceta sobre la platina de un microscopio simple binocular. Si se recurre a medios químicos, se macera el objeto con reactivos que le darán la consistencia adecuada para poder proceder a disociarlo.

Uno de los métodos empleados es el Schulze, que permite aislar los elementos duros: maderas, nudos, raíces, etcétera. El cuerpo que ha de disociarse se trata con ácido nítrico caliente con algunos cristales de clorato potásico. El objeto adquiere con este tratamiento un color blancuzco. Una vez que se ha dejado enfriar se lleva a un cristalizador con agua y se disocia con agujas. Este tratamiento es muy fuerte: destruye numerosas sustancias y modifica considerablemente las propiedades microquímicas de los tejidos. Por esto podemos emplear otro método más suave. Se pone la pieza que se va a disociar en alcohol de 90°. Se lava con agua destilada y se introduce el objeto en un tubo con potasa cáustica al 15 ó al 20 por 100. Al cabo de un tiempo prudencial, para no destruir excesivamente algunos tejidos delicados, se saca, se lava y se trata con una solución de ácido acético al 20 por 100.

Todos los elementos obtenidos con estos métodos, para ser observados al microscopio, se pasarán por alcohol, primero de 70° y luego de 90°, después por esencia de lavanda, y finalmente se montarán en bálsamo del Canadá.

CORTES

En la mayoría de los casos se podrán hacer a mano o con micrótomo de mano. Las muestras frescas se cortarán entre corcho seco. Las muestras conservadas en líquidos, entre corcho conservado en alcohol.

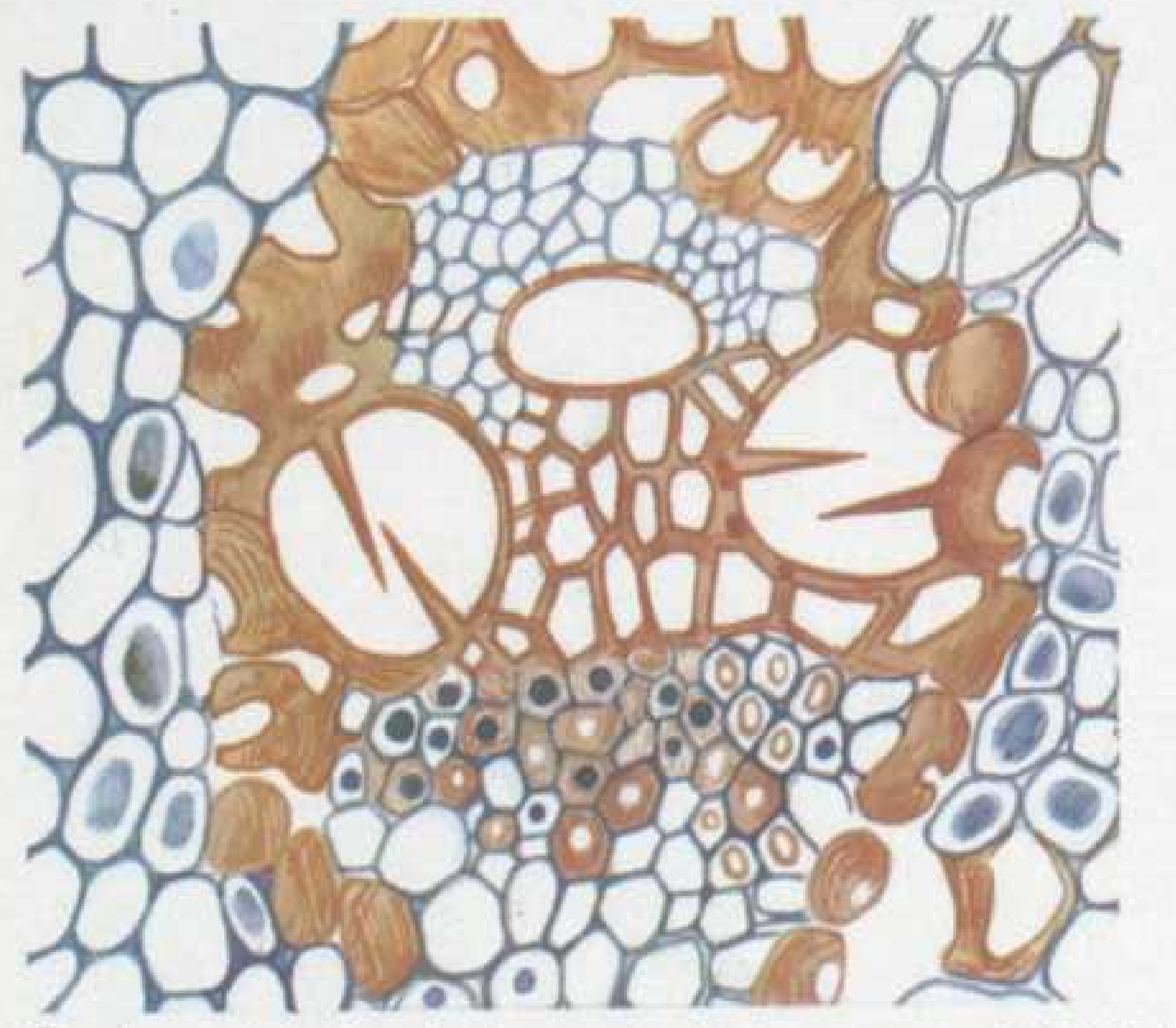
Las muestras duras se seccionan con una hoja plana en pequeños fragmentos. Las superficies de la hoja y del objeto se humedecerán con alcohol o glicerina. Se procurará que los cortes sean lo más finos posible, y se atacará la inclusión o la pieza sirviéndose de la hoja colocada en posición oblicua. (Figura 4.)

Los vegetales secos impregnados de alcohol y lavados con agua corriente se tratarán con una solución acuosa muy diluida de amoníaco, de lejía de sosa o de potasa y se cortarán entre corcho humedecido. En lugar de corcho podemos emplear medula de saúco. Los tejidos vegetales en que la lignificación no sea muy profunda, pueden incluirse en parafina y cortarse en serie. Los tejidos frescos se deshidratarán progresivamente en alcohol, desde 25° a 96°, y luego se incluirán en parafina y se cortarán.

Las muestras muy lignificadas han de ser sometidas a un tratamiento preliminar: primero se introducen en un baño de agua; después, en acetona, y, últimamente, en acetato de celulosa al 12 por 100, que se deja actuar de 6 a 10 horas, según el grosor de la muestra.

Todos los cortes conseguidos los introduciremos, a medida que se vayan obteniendo, en un cristalizador lleno de agua o de alcohol (fig. 5). Para su posterior montado con cualquiera de los métodos que comúnmente se emplean, resina, bálsamo o colodión, se habrán de manipular con una aguja o un pincel, nunca con pinzas.

ARQUEGONIADAS Y EMBRIOFITAS



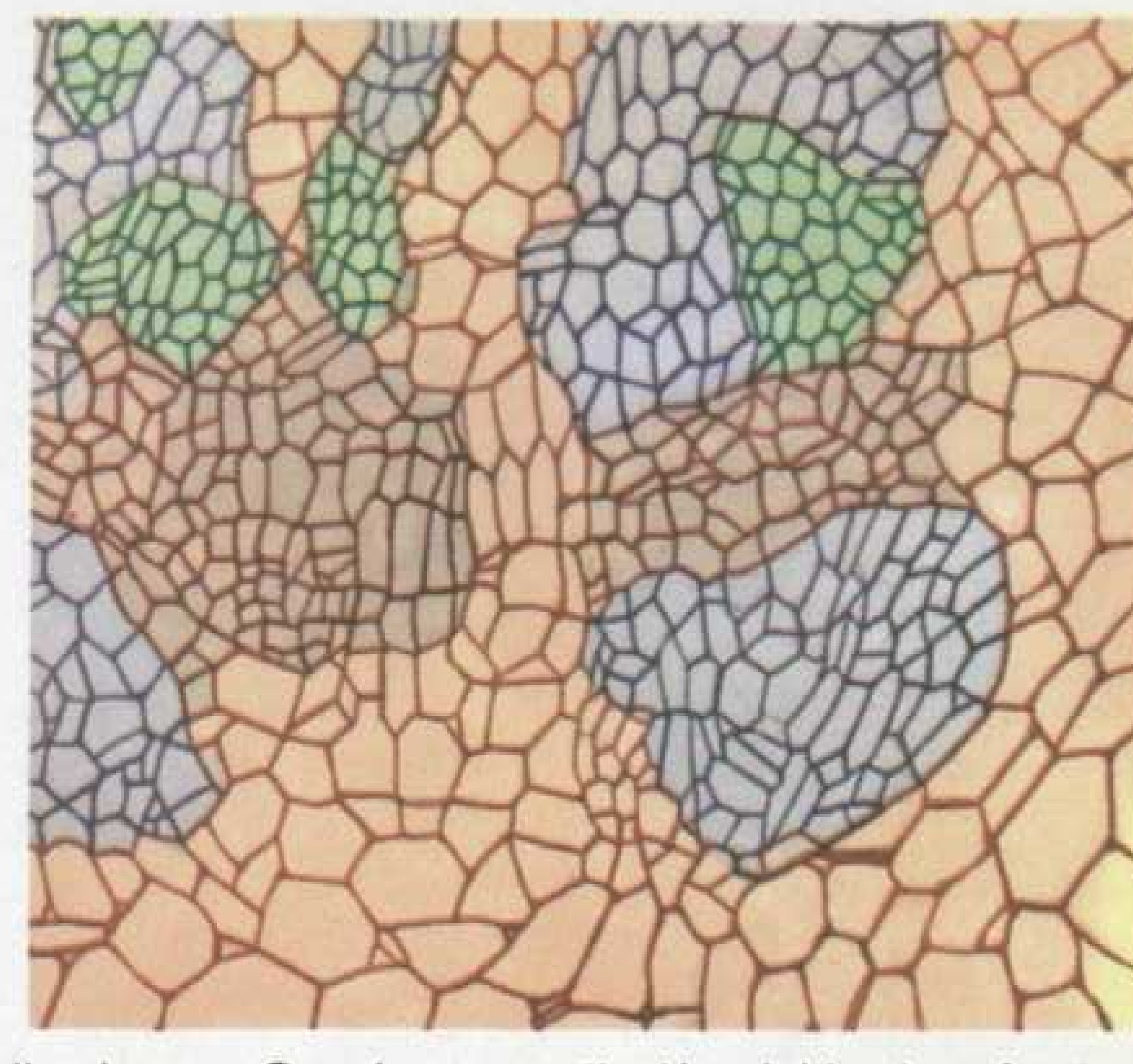


Fig. 1. — A la izquierda: corte de la parte central del tallo de una Gramínea con tinción doble de safranina y azul de metileno. A la derecha: corte de un tallo de muérdago con tinción doble de carmín de alumbre y verde yodo.

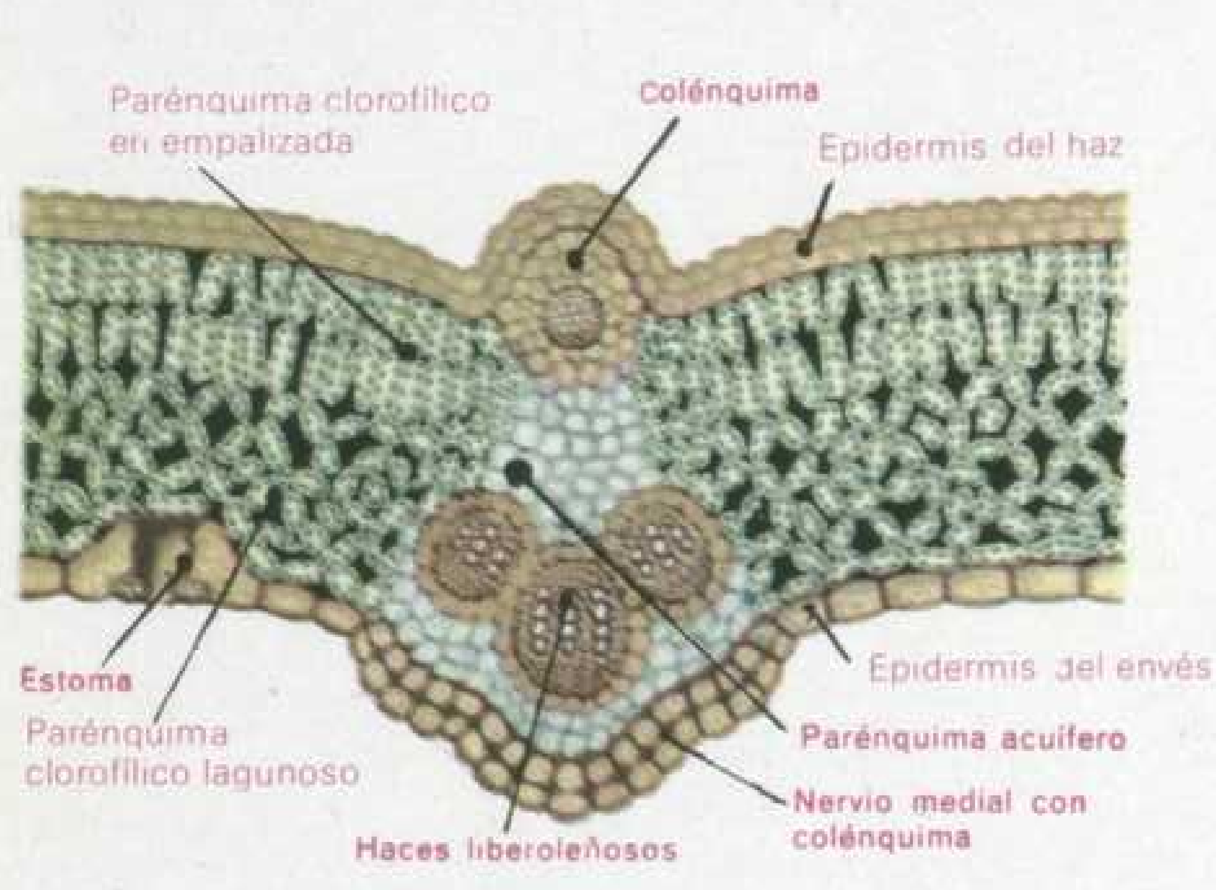




Fig. 2. — Sección transversal de una hoja de Dicotiledónea.

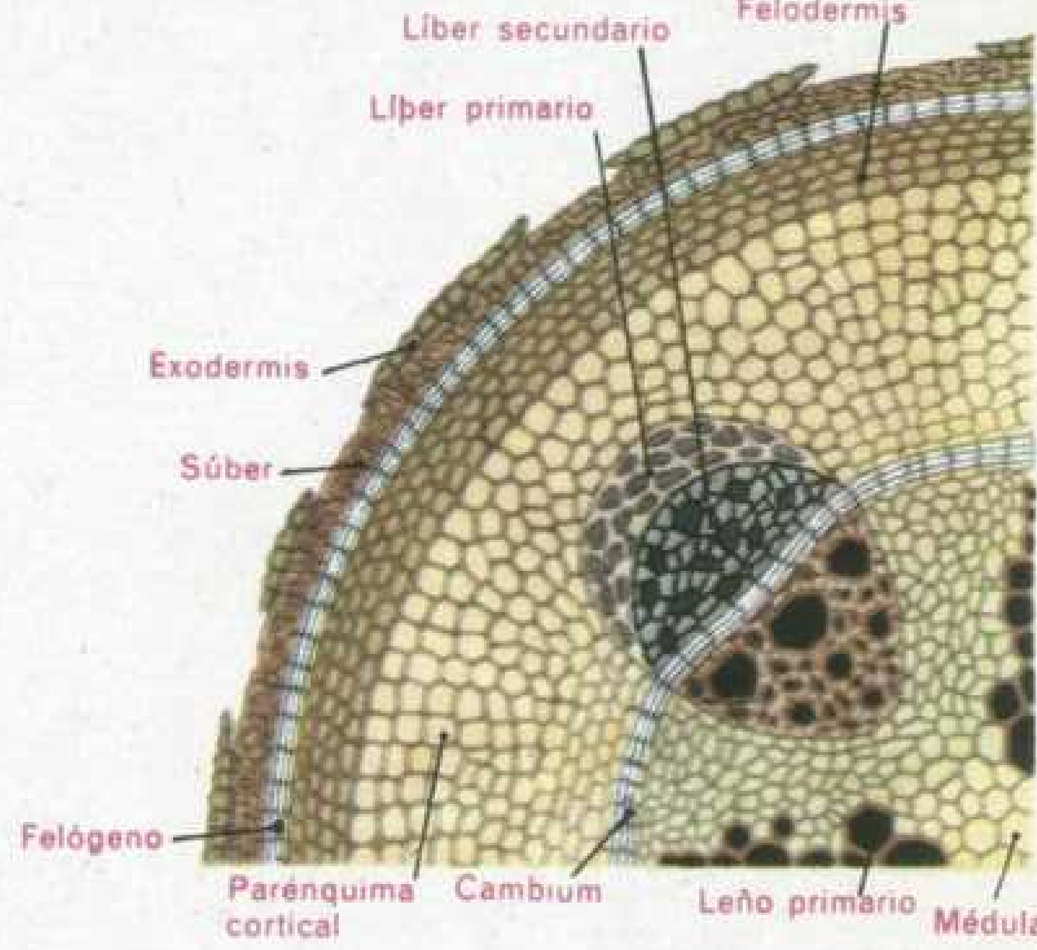


Fig. 3 – Corte transversal de un tallo de estructura secundaria

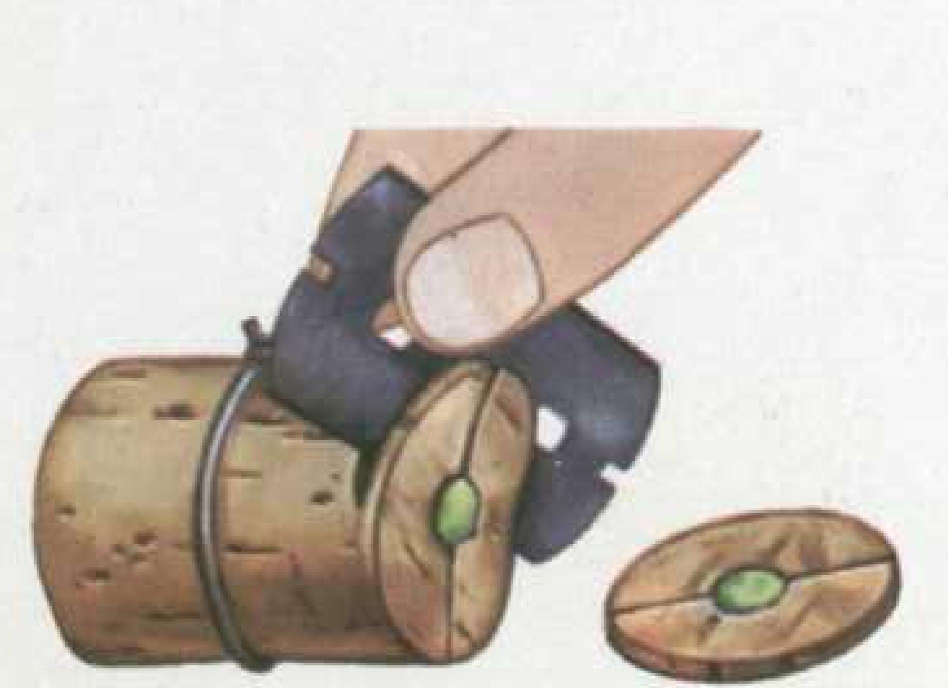


Fig. 4 – Modo de practicar los cortes en un material englobado en corcho



Fig. 5. — Preparación de cortes en un cristalizador, depositándolos en él mediante un pincel.

HISTOQUÍMICA

Almidón

La solución de yoduro potásico yodado, solución Lugol, permite descubrir en cortes y muestras la existencia de granos de almidón.

Glucosa

Se corta la muestra que se va a examinar, de manera que tenga un espesor de dos o tres capas de células y se trata con líquido de Fehling:

a)

Sulfato de cobre	0,75	gr.
Agua destilada	25	ml.

b)

Tartrato de sodio y potasio (sal de Seignette)	4	gr.
Agua destilada	25	ml.

c)

Sosa cáustica	4	gr.
Agua destilada	25	ml.

En el momento en que van a emplearse se toman cinco mililitros de cada una de las soluciones *a*), *b*) y *c*), a los que se añaden diez mililitros de agua destilada; se hierve esta mezcla y se introducen los cortes en ella. En pocos segundos tomarán éstos un color rojo a causa de la reducción del sulfato de cobre. Se montan en algunas gotas de licor de Fehling. La preparación pone de manifiesto los cristales de óxido de cobre. La levulosa, lactosa, glucosa y algunos glucósidos reducen el líquido de Fehling.

Prótidos

La acción del ácido nítrico da coloración amarilla a las sustancias proteicas. Esta coloración puede lograrse también adicionando a la preparación lejía alcalina, amoníaco o potasa. Generalmente se utiliza el reactivo Millon.

Reactivo Millon.

Mercurio	1	ml.
Acido nítrico	9	»
Agua destilada	10	»

Al cabo de unas horas, generalmente seis, los prótidos toman coloración rosa o rojiza.

Grasas

Se introducen los cortes durante diez minutos en una solución alcohólica saturada de rojo Sudán, que se filtra seguidamente. Se lavan con agua y se montan en glicerina o en gelatina glicerinada. Los cuerpos grasos se colorean de rojo vivo.

El rojo Sudán colorea ciertas esencias, las resinas y ceras y el látex. Una solución de cianina al 1 por 100 colorea los aceites en azul. Una disolución de ácido ósmico al 1 por 100 colorea los cuerpos grasos y las esencias en marrón oscuro.

Celulosa

Se introducen los cortes, aclarados por la acción del hipoclorito de sodio, en solución Lugol durante varios minutos. Se montan entre porta y cubre. Se pone en el borde del cubre una gota de ácido sulfúrico al tercio. La celulosa toma una coloración azul. Si tarda ésta en aparecer, se aumenta la dosis de ácido sulfúrico.

Puede emplearse otro método: introducir los cortes en una solución acuosa de rojo Congo al 1 por 100, que se deja actuar durante varios minutos. La celulosa aparece en color rojo.

Cristales de oxalato cálcico

En las células se encuentra ácido oxálico en forma de oxalato potásico o cálcico. Este último es muy corriente en las células vegetales. Para observarlo, es suficiente hacer cortes de los tejidos y examinarlos. El oxalato de calcio se reconoce en la forma cristalina. (Fig. 2.) A diferencia de los cristales de carbonato cálcico, es insoluble en ácido acético. Es soluble en los ácidos clorhídrico y sulfúrico.

Almidones, harinas y féculas

Se pueden reconocer examinándolos sobre un porta en una gota de agua, a la que se añade una gota de solución Lugol. Este licor penetra por capilaridad en los granos del almidón y los colorea de azul violáceo, lo cual permite diferenciarlos de otros elementos que pudieran contener las harinas.

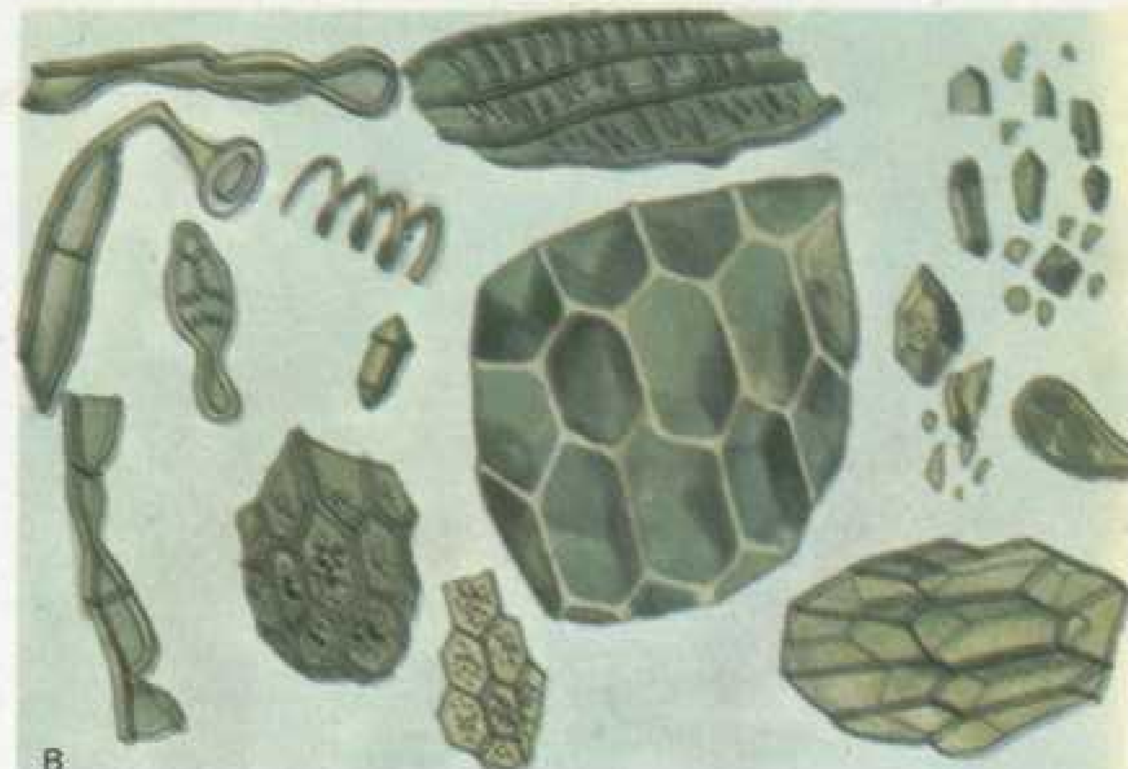
El microscopio polarizante permite reconocer sin preparación los diferentes granos de almidón de la fécula del arroz, de la alubia, de la patata, y otros. (Fig. 3.)

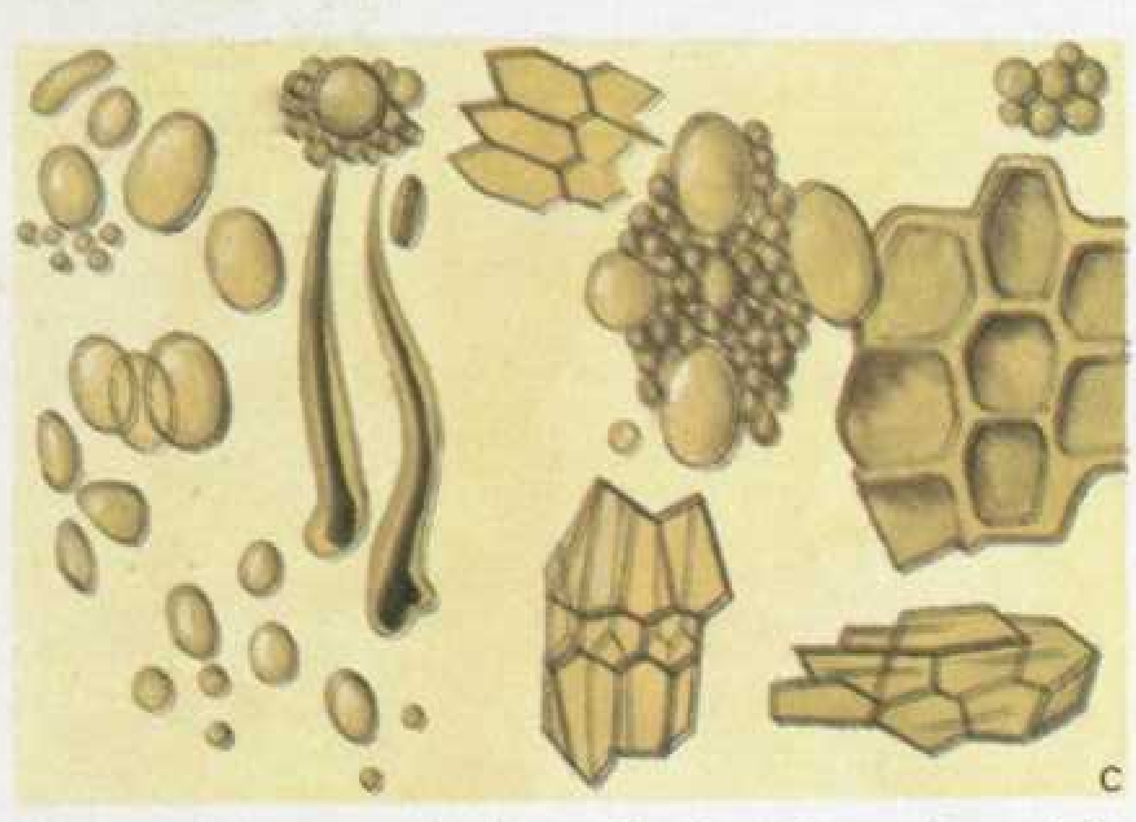
Polvos de hojas. Para el estudio de los polvos vegetales (fig. 1), generalmente medicinales, se puede recurrir al sistema más sencillo, que consiste en impregnar de agua destilada una porción de polvo. Al cabo de unos minutos se toma un poco de esta masa, se deposita encima de un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos sobre el que se hace ligera presión para disociar los elementos. Si el polvo no se empapa fácilmente, se emplea, en vez de agua, este líquido:

Cloral	5	partes
Agua	5	»
Glicerina	10	»

HISTOQUIMICA







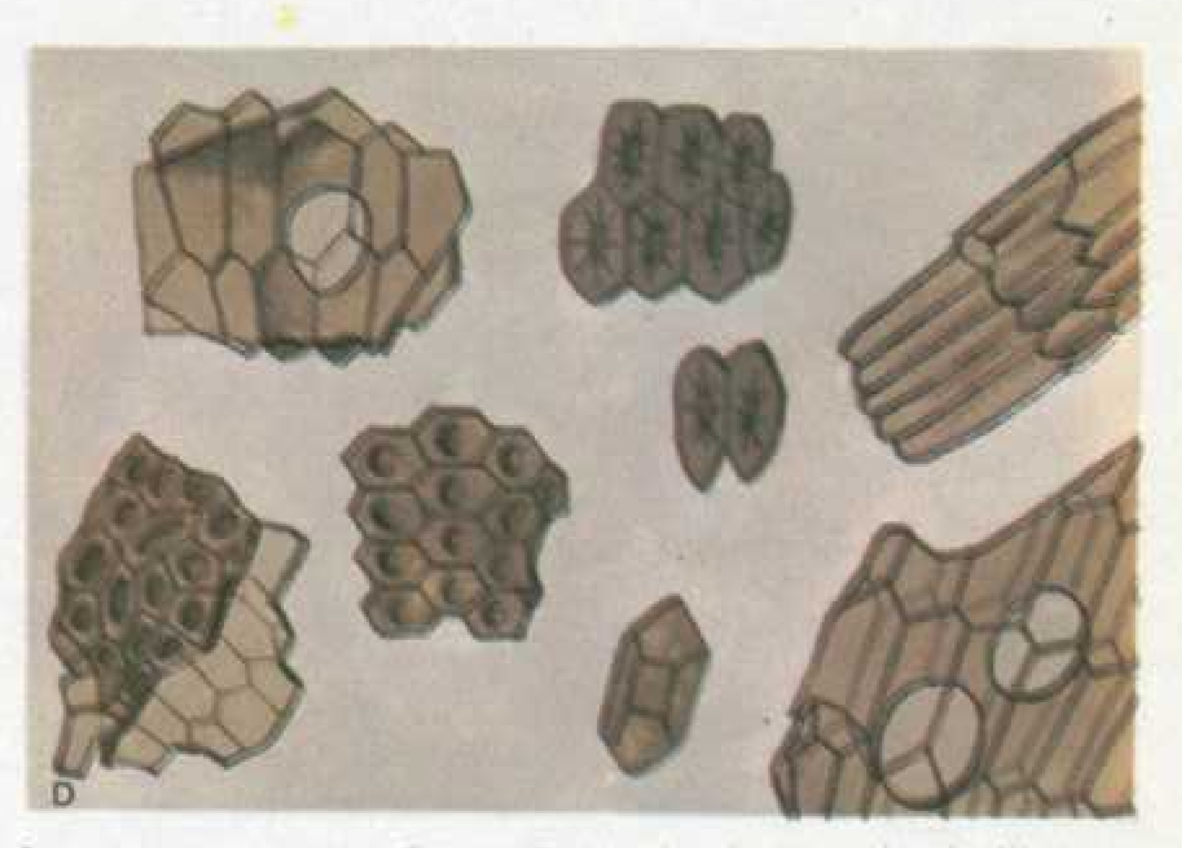


Fig. 1. — Polvos vegetales. En A, polvos de azafrán *(Crocus sativus)*, en B, polvos de hojas de belladona *(Atropa belladona)*, en C, harina de trigo *(Triticum sativum)*, y en D, polvo de pimienta negra.



Fig. 2. — Varios cristales de oxalato cálcico.

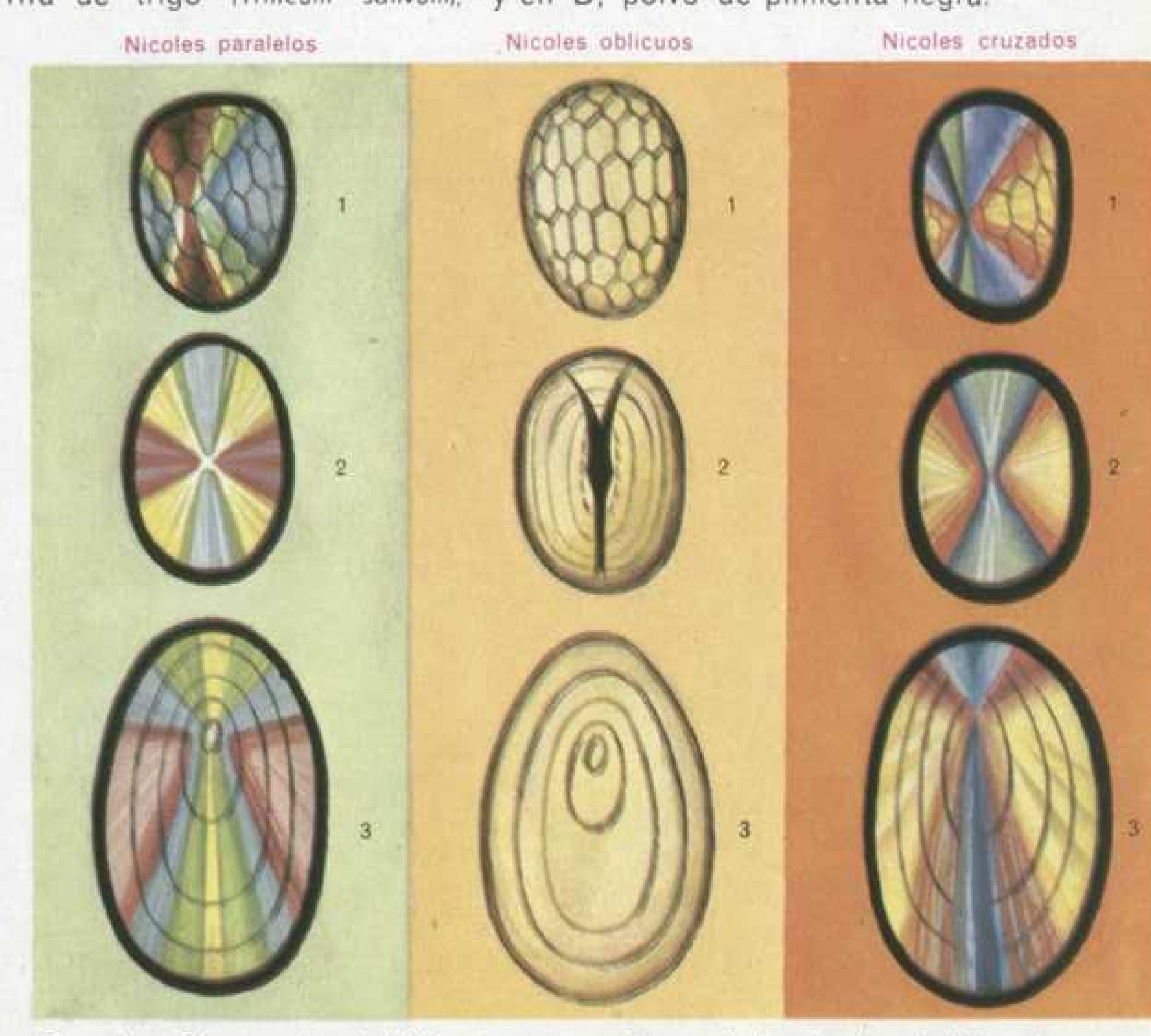


Fig. 3. — Granos de almidón vistos con luz polarizada. 1, almidón de arroz; 2, almidón de alubia, y en 3, almidón de patata.

ZOOLOGÍA

FLAGELADOS

Este grupo puede ser incluido en la Zología y en la Botánica, puesto que, por sus especiales características, participa de las de ambas y no está bien determinado su lugar en la clasificación. (Fig. 1.)

Nosotros los distinguiremos en Zooflagelados y Fitoflagelados. Los primeros son incoloros y saprozoicos. Los segundos tienen pigmentos y hacen vida heterótrofa.

Tanto unos como otros se caracterizan por tener flagelos y vivir en medios líquidos. Unos son parásitos; otros, marinos, y el resto, dulceacuícolas. Grupos importantes de Flagelados son las Leishmanias (fig. 3) y los Tripanosomas. (Figs. 2 y 4.) Hay entre los Flagelados y los Rizopodos grupos intermedios que tienen algunas características comunes, pues poseen flagelos y emiten seudópodos. Algunos autores forman con ellos un solo grupo, el de los Rizoflagelados.

Como desde el punto de vista práctico que orienta nuestra labor solamente nos interesan los métodos de observación de los Flagelados prescindiendo de su posición en la sistemática, vamos a dar las reglas generales para su preparación y examen.

FITOFLAGELADOS

Preparación de los Fitoflagelados. La fijación y coloración de los Flagelados, de los que damos varias especies en la lámina, puede efectuarse entre porta y cubre, o bien en la centrífuga, concentrando la masa de Flagelados.

Podemos incluirlos en agar-agar-parafina y lograr cortes muy finos del bloque así obtenido.

Generalmente se fijan en líquido de Fleming modificado, citado por Grassé:

Acido ósmico al 0,5 % . . 1 vol.
Acido crómico al 0,5 % . . 3 »
Acido acético, alrededor de 5 gotas por . . . 100 ml.

Se recomiendan también la quinona, el sublimado alcohólico, el líquido de Sachaudin, las mezclas picro-formol acético de Bouin, etc.

La fijación dura de 10 minutos a 24 horas.

Coloración. Para teñir protoplasma y núcleos se emplea habitualmente la hematoxilina o el carmín. Para poner de manifiesto los flagelos se recurre a la tinción negativa con tinta china o con nigrosina.

ZOOFLAGELADOS

Preparación de los Zooflagelados intestinales. Pueden examinarse en fresco, en fondo oscuro, con las mucosidades, heces o líquidos que los contengan. Los parásitos se ponen en un porta, y si el líquido es muy espeso, se aclarará con unas gotas de solución fisiológica diluida. Se extiende la preparación finamente y se fija en el líquido de Bouin o en el picro-formol. Para los *Trichomonas* se emplea el líquido siguiente:

Solución acuosa saturada de sublimado. 100 vol.
Acido tricloroacético . 0,5 a 1 gr.

Se calientan con este líquido durante unos diez minutos a la temperatura de 40 a 45º.

Una vez fijados, se colorean según el método que exponemos a continuación.

Hematoxilina férrica de Heindenhain:

I. Solución al 3 % de alumbre de hierro.
II. Solución al 1 % de alumbre de hierro.
III. Solución acuosa de hematoxilina al 1 %, que se prepara así:

Agua destilada . . . . 90 ml.
Alcohol absoluto . . . 10 »
Hematoxilina . . . . 1 gr.

Se deja reposar durante 24 horas y se procede de la manera siguiente:

1.º Se cubre el frotis con la solución mordiente de alumbre de hierro (I) durante 12 ó 24 horas.
2.º Se lava con agua destilada.
3.º Se colorea con la solución de hematoxilina (III) durante 30 minutos a 24 horas, según el espesor.
4.º Se lava con agua destilada.
5.º Se diferencia con la solución de alumbre (II).
6.º Se lava con agua destilada.

El núcleo y los centrosomas quedan teñidos en negro; el protoplasma, en gris claro.

Preparación de Flagelados, parásitos en la sangre. Pueden observarse en fresco. Se pone una gotita de sangre entre porta y cubre. Se observa con objetivo potente: los tripanosomas se reconocen por su movimiento y por los desplazamientos que provocan en los hematíes.

Para observar en frotis teñido, una vez efectuado el frotis, y ya seco, se colorea por el método de Tribondeau, que fija y tiñe al mismo tiempo, y se procede igual que para los treponemas.

Los parásitos quedarán teñidos en rosa, diferenciándose perfectamente de las células sanguíneas.

FLAGELADOS



Fig. 1. — Algunos Flagelados: 1, *Englena viridis*, 2, *Bodo caudatus*, 3, *Mastigamoeba aspera*, y 4, *Volvox aureus*.

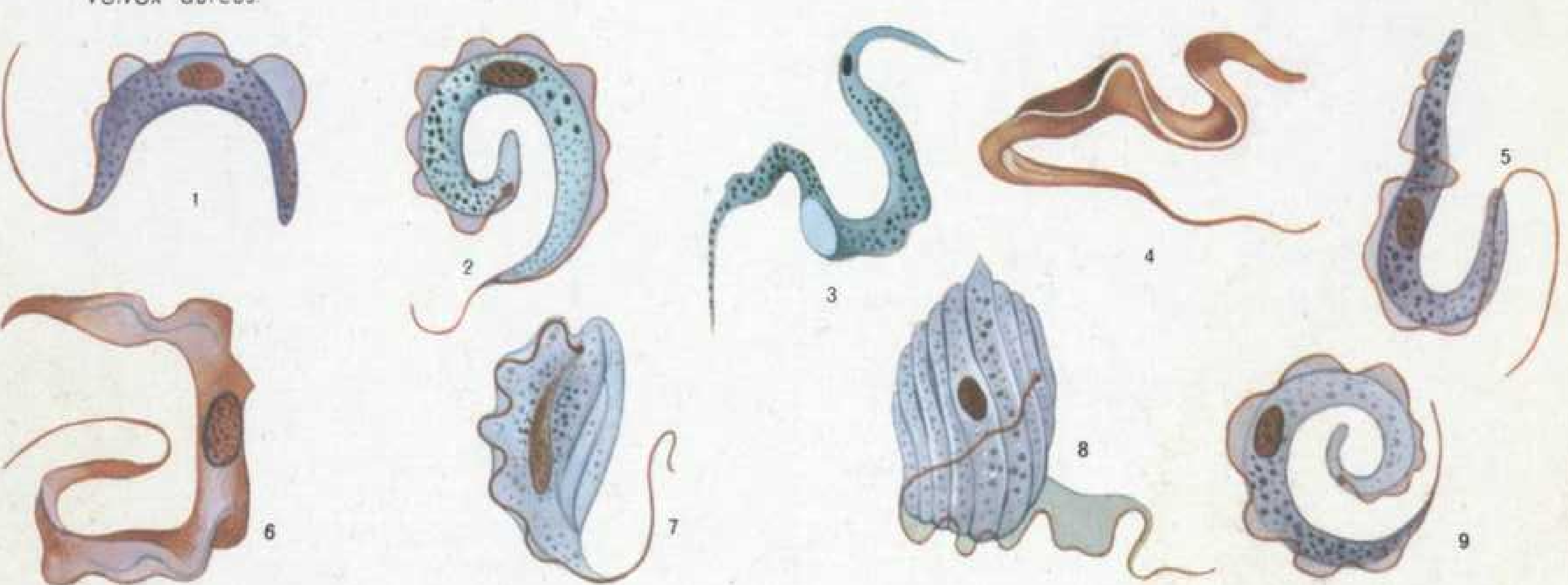


Fig. 2. — Flagelados del grupo de los Tripanosomas: 1, *Trypanosoma avium*, 2, *Trypanosoma solea*, 3, 4, 5 y 6, *Trypanosoma granulosum*; 7, *Trypanosoma hylae*, 8, *Trypanosoma rotatorium*, y 9, *Trypanosoma rajae*. Tinciones diversas (eosina, safranina y tionina).

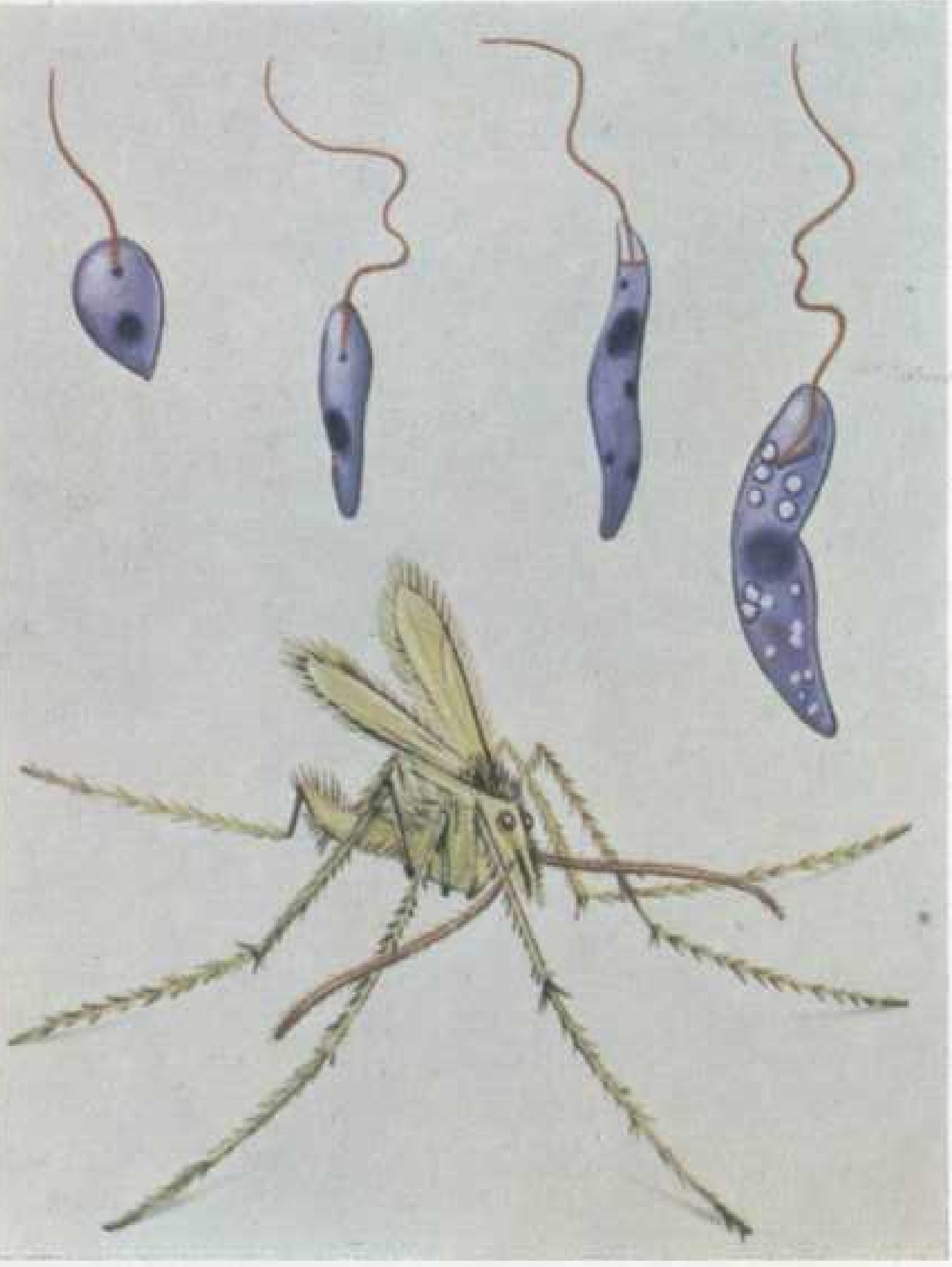


Fig. 3. — *Leishmania tropica*, Flagelado parásito, y su mosquito transmisor, el *Phlebotomus papatasi*.

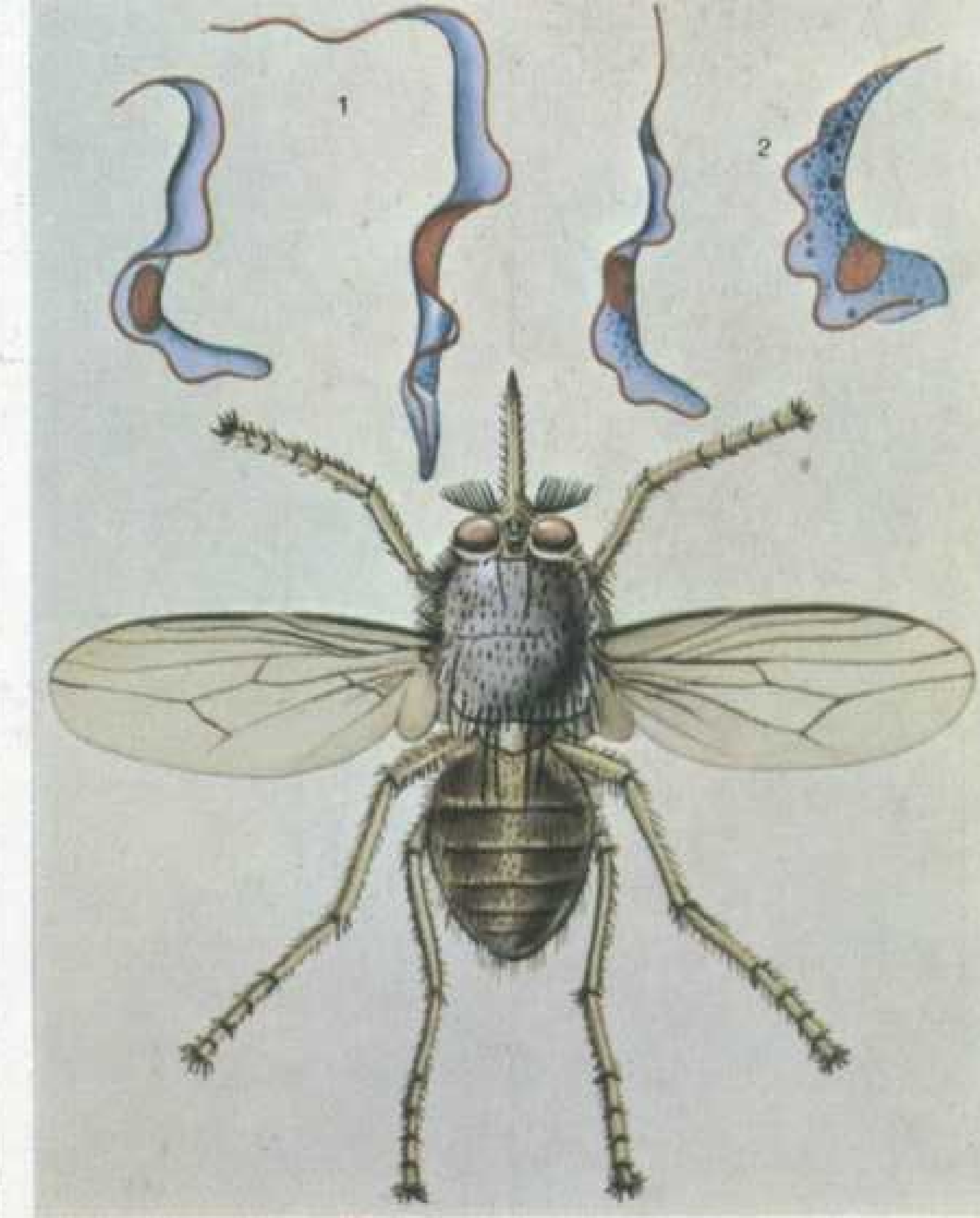


Fig. 4. — Flagelados parásitos: 1, *Trypanosoma rhodesiense* 2, *T. gambiense* y la mosca tse-tsé (*Glossina palpalis*)

RIZOPODOS

Son protozoos desprovistos de película superficial rígida, lo cual les permite emitir seudópodos, que utilizan para la captación de alimentos y para la locomoción. Los seudópodos son lobosos, filiformes, ramificados o reticulados.

Algunas familias están provistas de exoesqueleto o endoesqueleto, y éste es unas veces calcáreo y otras silíceo o quitinoso. Su nutrición es heterótrofa, y muchos de ellos son parásitos.

Los clasificamos en Protomixinoideos, Micetozoos, Amebinos, Testáceos, Foraminíferos, Heliozoos y Radiolarios.

Protomixinoideos

Grupo pequeño con seudópodos reticulados y flagelos. Parásitos de algas (*Vampirella* sobre *Spyrogira*). (Fig. 1.)

Micetozoos

Tienen formas plasmodiales plurinucleadas y son de notable tamaño, con coloraciones diversas, ricas en granulaciones. Sus esporas producen estados ameboides y estados flagelados. Se enquistan, y de cada quiste nace luego una mixameba.

De la fusión de varias de estas mixamebas se forma finalmente un nuevo plasmodio. Se considera este grupo afín al de los hongos. Se les llama también Mixomicetes. Es un grupo numeroso. Ejemplo: *Plasmodiophora brassicae*. (Fig. 2.)

Amebinos

De cuerpo desnudo, diferenciado en ectoplasma y endoplasma. Forma seudópodos lobados. Comprende este grupo todas las amebas parásitas y acuáticas: *Amoeba proteus*, de aguas dulces. *Trichamoeba pallida*, marina (figura 3); la *Entamoeba histolytica*, que vive parásita en el intestino humano y produce la disentería amebiana, y la *Entamoeba coli*, parásita, pero no patógena.

Testáceos

Amebas recubiertas por una teca generalmente provista de abertura. A menudo está formada por materiales diversos cementados entre sí. Como géneros más corrientes cabe citar la *Arcella* (fig. 4), la *Difflugia*, etc.

Heliozoos

Son de forma más o menos esférica, y están provistos de axopodios radiantes. Espículas silíceas. Viven en aguas dulces: *Actinosphaericum eichhorni, Actinophrys sol*. (Fig. 5.)

Foraminíferos

Están provistos de caparazón calcáreo formado por una o por diversas cámaras con una o con varias aberturas, por las cuales emiten los seudópodos. Suelen tener vacuolado el ectoplasma. Son casi exclusivamente marinos, y sus caparazones forman sedimentos en los fondos. Son muy importantes las especies fósiles *Nummulites* y *Globigerinas*. Las actuales son muy numerosas: *Globigerinas, Textularia Polystomella, Rotalia*, etc. (Lám. E/3, fig. 1.)

Radiolarios

Rizópodos pelágicos con simetría homoaxona o monoaxona. Parecidos a los Heliozoos. El citoplasma está dividido en dos partes, la extracapsular y la intracapsular, separadas por una cápsula central. Tienen una o más aberturas y un elegante esqueleto silíceo o de sulfato de estroncio, formado por diversas agujas orientadas en todas direcciones, con una cápsula cribada concéntrica. (Lám. E/3, fig. 2.) En algunos casos sus esqueletos, usualmente de espículas silíceas, son muy reducidos. Algunos carecen totalmente de ellos. Los Radiolarios integran a veces colonias, y contribuyen no poco a formar sedimentos oceánicos (barros de Radiolarios, estratos rocosos: trípoli, harina fósil).

Se subdividen en *Acantarios*, con esqueleto homoaxónico de sulfato de estroncio; *Espumelarios*, con esqueleto silíceo homoaxónico y cápsula interna uniformemente perforada; *Naselarios*, con esqueleto silíceo monoaxónico y cápsula interna perforada por un solo poro, y *Feodarios*, con esqueleto silíceo homoaxónico y cápsula interior perforada por una abertura principal y otra secundaria.

RIZOPODOS

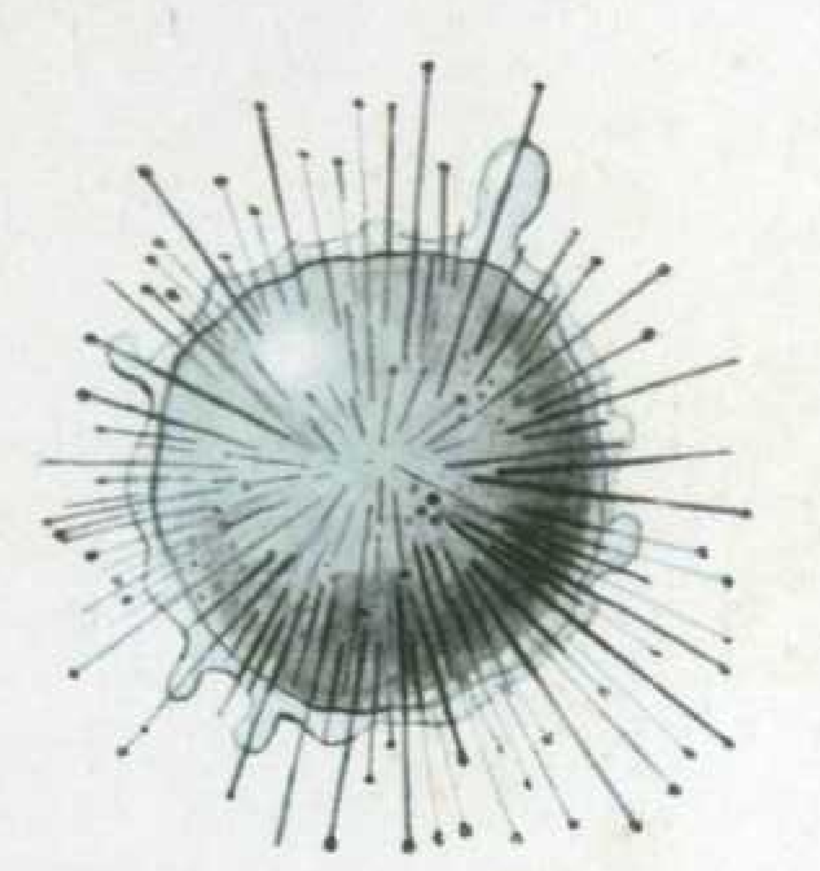


Fig. 1. — Protomixinoideos. *Vampirella lateritica.*

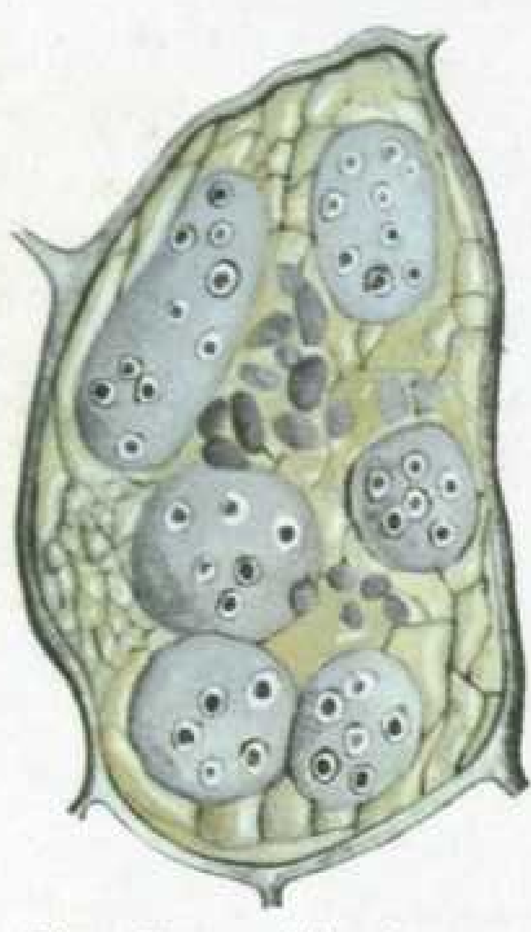


Fig. 2. — Micetozoos. *Plasmodiophora brassicae.*

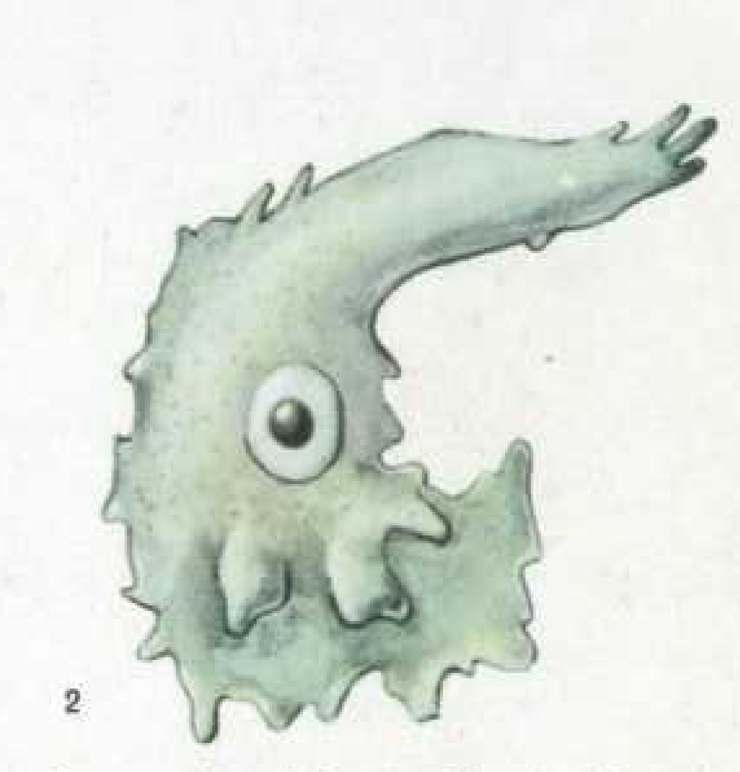


Fig. 3. — Amebinos. En 1, *Amoeba proteus*; en 2, *Trichamoeba pallida*.

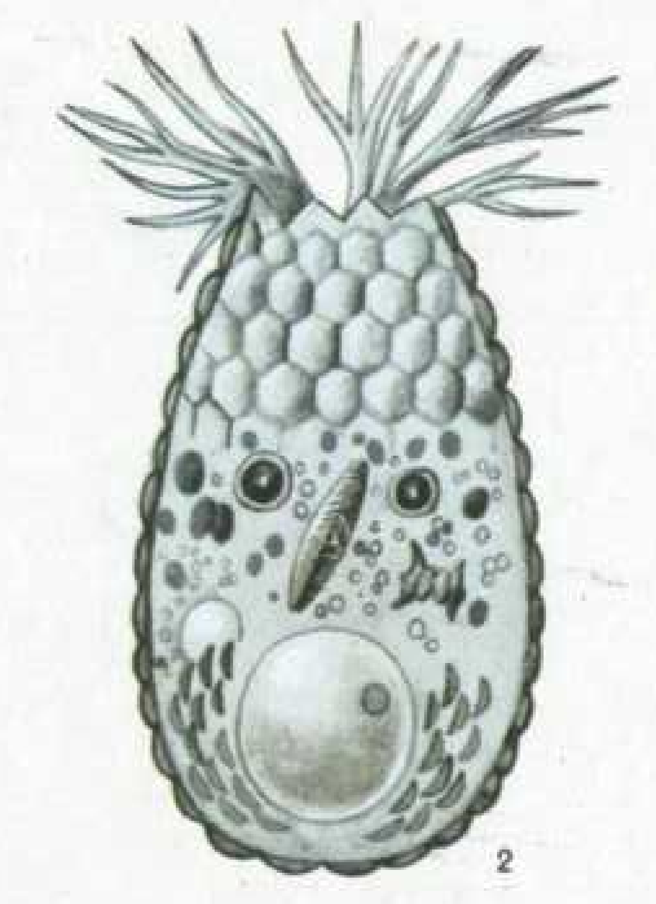


Fig. 4. — Testáceos. En 1, *Gromia oviformis*; en 2, *Euglypha tuberculata*, y en 3, *Arcella dentata*

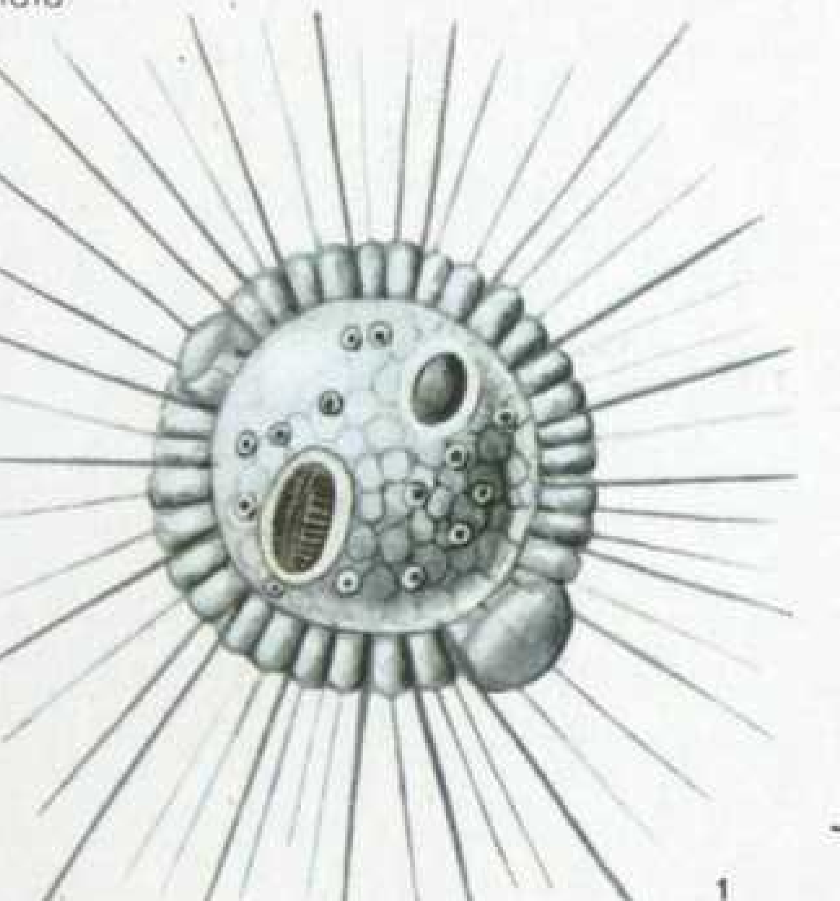


Fig. 5. — Heliozoos. En 1, *Actinosphaericum eichhorni*, en 2, *Actinophrys sol*.

Recolección de Rizópodos

Para hacer una buena recolecta de estos organismos hay que buscarlos en estanques, pantanos o aguas encharcadas que contengan hojas y detritos vegetales en descomposición. Esto es fácil de conseguir con ayuda de un tubo de vidrio de unos 60 centímetros de largo y con un diámetro aproximado de un centímetro. Se tapa un extremo del tubo con un dedo y se introduce el otro extremo hasta el fondo o las hojas que se desea recoger. Se retira el dedo del extremo superior, y el agua, por presión, llena el tubo, arrastrando aquellos materiales que interesan. Se vierte el contenido del tubo en una cápsula, donde, una vez sedimentados los materiales, se recogerán con una pipeta los fragmentos más interesantes y que parezca que pueden contener rizópodos. También pueden encontrarse encima de las hojas sumergidas de ranúnculos, nenúfares y musgos de las rocas húmedas. Las amebas parásitas, las encontraremos en las mucosidades o en las heces.

Preparación de las amebas y Heliozoos

Pueden observarse en vivo. Para ello se pone entre porta y cubre una gota de agua o de solución fisiológica y, en ella, restos de hojas o sedimentos de la muestra recogida.

Para verlas con más detalle han de fijarse y teñirse encima de un porta.

Se fijan con el líquido de Bouin y se colorean con hematoxilina férrica o por el método de las coloraciones panópticas.

El método de Pénard consiste en aislar encima de un porta una gota de agua que contenga amebas, extraer con un papel secante el agua, sin absorberla toda y añadir bruscamente alcohol absoluto, quedando así los seudópodos fijados. Se desecha el alcohol sobrante y se colorea la preparación con carmín al bórax. Se lava con agua, se pasa por alcoholes y se monta con bálsamo del Canadá.

Preparación de los Foraminíferos

Se los encuentra en el limo del fondo o sobre los organismos marinos. Algunas formas son pelágicas, como las Globigerinas. Pueden recogerse en las playas con los detritos de algas, Briozoarios o Hidrarios arrojados por el mar. Los Foraminíferos vivos se encuentran en los puertos, en los criaderos de moluscos y sobre el limo en la desembocadura de los ríos. Los residuos recogidos, tamizados y separados de las partículas grandes, se conservan en tubos etiquetados.

Hay un método para separar los Foraminíferos del resto de los organismos y partículas que contenga la muestra: consiste en hacerlos flotar, llenando sus caparazones de aire o gas, haciendo burbujear gas en el fondo del recipiente que los contiene. Los Foraminíferos flotarán y se irán acumulando en la superficie, junto a las orillas. Las especies grandes no subirán, pero pueden ser recogidas del fondo con facilidad. Estos caparazones se mojan en alcohol y se decantan varias veces, añadiendo un poco de sosa cáustica. Se deja secar todo el sedimento obtenido y se procede a montarlo. Se emplea el método del doctor Lacroix. Este procedimiento permite llenar las cavidades de los caparazones poniendo de relieve su estructura laberíntica.

Se deshidrata con alcohol de 96° y se seca con precaución encima de una platina caliente. Una vez seca, la preparación se pone en una gota de glicerina caliente y, después de desechar la glicerina sobrante, se cubre con una gota de gelatina glicerinada fundida. Se enfría bruscamente y, por descompresión, el líquido penetrará en el interior de las cavidades.

Preparación de los Radiolarios

Se recogen por medio de sondeos o de pescas pelágicas, igual que las diatomeas marinas. Las Radiolarios vivientes deben fijarse con ácido ósmico, formol, líquido de Fleming, etc. Se conservan en alcohol o agua formolada al 5 por 100. Se pueden teñir con picro-carmín o con tinturas de hematoxilina. Se montan con bálsamo.

RIZOPODOS

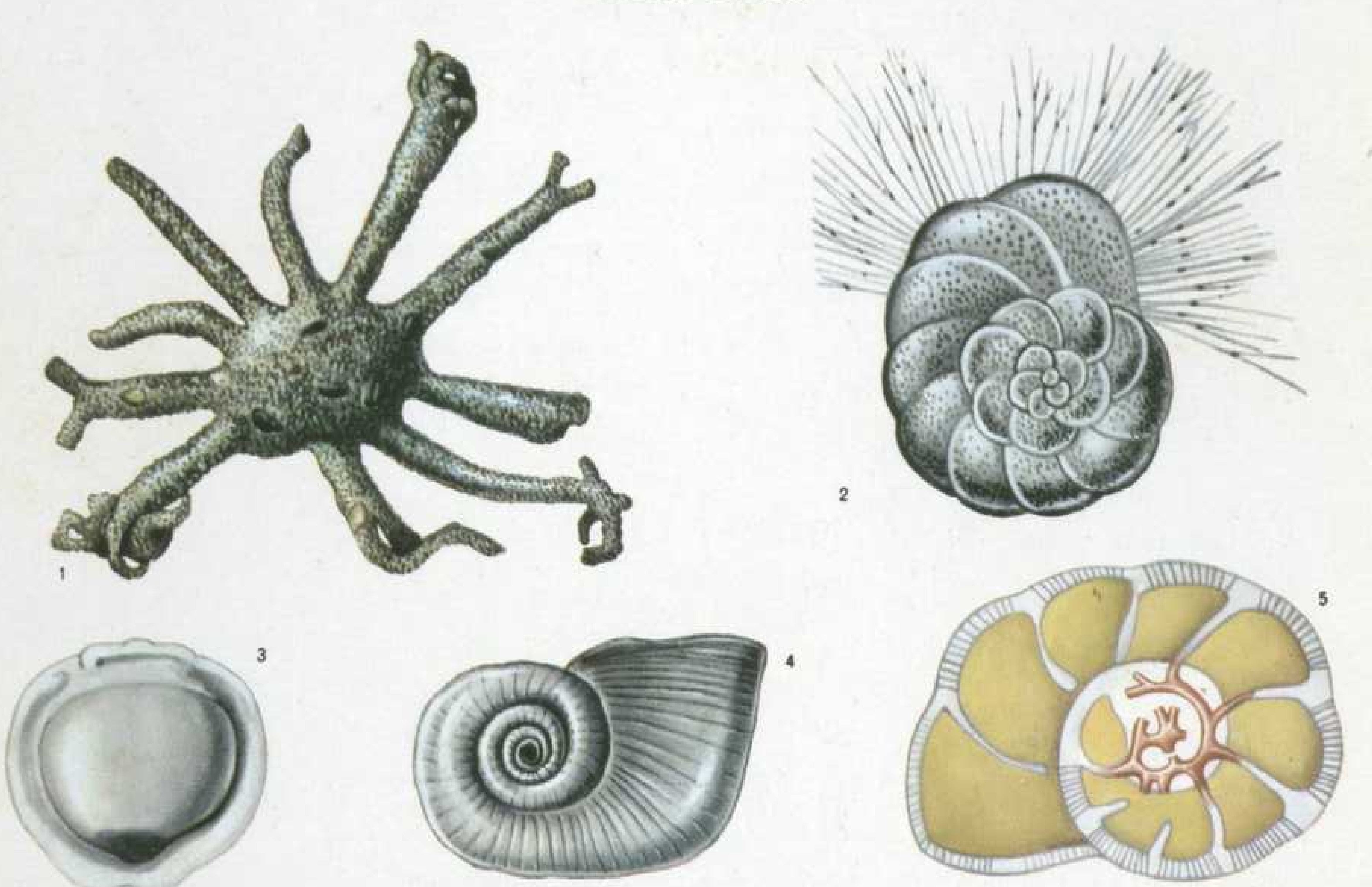


Fig. 1. — Foraminíferos. En 1, *Astrorhiza limicola*, en 2, *Rotalia*, en 3, *Biloculina depressa*, en 4, *Cornuspira foliacea*, y en 5, *Nonionina asterizans*

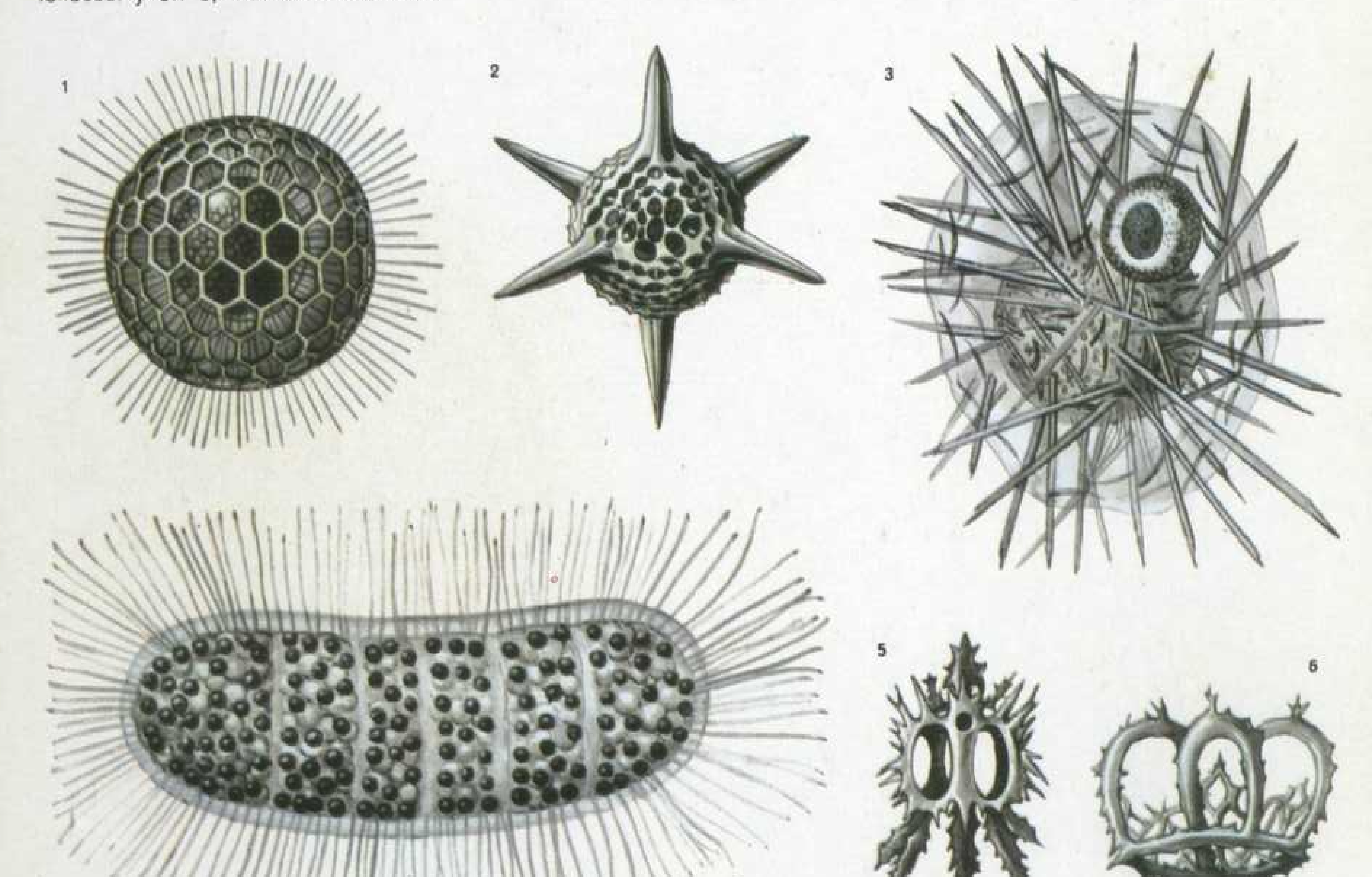


Fig. 2. — Radiolarios. 1, *Heliospora*. 2, *Hexalonche*. 3, *Aulacantha*. 4, *Collozoum inerme*, radiolario colonial sin esqueleto, y 5 y 6, esqueletos silíceos, 5 de *Tympaniscus*, y 6 de *Acanthodesmia*.

INFUSORIOS

Los infusorios o ciliados son organismos unicelulares cuyo cuerpo está provisto de cilios.

Se les llama infusorios por su facilidad para desarrollarse en líquidos procedentes de infusiones vegetales. Poseen membrana bien definida, citóstoma con vestíbulo y perístoma para atraer el alimento Poseen un macronúcleo y uno o dos micronúcleos. Viven en las aguas dulces y en las saladas; algunos son parásitos; hay especies fijas y pedunculadas. Raramente forman colonias. Su tamaño oscila entre las 12 micras y los 3 milímetros.

Citemos entre los que más llaman la atención: *Paramecium caudatum* (figura 1), *Opalina ranarum* (fig. 2), *Stentor polymorphus* (fig. 3), *Vorticella nebulifera* (fig. 4), *Stylonichia mytilus* (figura 5) y *Didinium* (fig. 6).

Recolección

Se encuentran en las aguas dulces ricas en materia orgánica, en infusiones vegetales antiguas, en los musgos, plantas acuáticas, parásitos de vertebrados, etc. Los productos de cada pesca se pueden conservar en acuario, donde habitualmente se desarrollan bien. Un buen sistema de recolección es el de los portas sumergidos, del profesor Fauré-Fremiet: los ciliados se pegan a todos los objetos sumergidos. Igualmente lo hacen otros protozoos, por lo que este método puede emplearse para los protozoos en general.

Observación y preparación

Podemos observarlos *in vivo* en una gota de agua sin cubre, para evitar deformaciones, o por el método de la gota pendiente. La adición a la gota de partículas de rojo neutro, polvo tornasol o rojo Congo permite observar fenómenos de digestión.

Estos organismos se mueven muy rápidamente, y ello dificulta su observación. Para hacer más lentos sus movimientos se puede emplear una solución de goma arábiga, de la que se añade una o dos gotas al líquido que se va a observar; y, al aumentar la viscosidad de éste, los infusorios se mueven más lentamente o casi se inmovilizan, según la cantidad de goma arábiga añadida. Si añadimos a la goma arábiga una pequeña porción de colorante, por ejemplo, azul de metileno, obtendremos ventajas desde el punto de vista óptico. Otro sistema para observarlos en fresco consiste en narcotizarlos con unas gotas de agua cloroformada o con éter.

Para fijar y colorear los infusorios se emplea el método de Gray.

Se prepara la solución madre siguiente:

Ácido pícrico	1 gr.
Bicloruro de mercurio . .	1 »
Alcohol de 96°	100 ml.

Para fijarlos se utiliza la siguiente mezcla:

Solución madre . . .	X gotas
Éter	III »
Ácido acético	II »
Formol	V »

Se deja actuar esta mezcla durante 10 minutos. Se lava la preparación con alcohol hasta que desaparece el color amarillo y se tiñe con una gota de hematoxilina con alumbre, la cual se pone encima el tiempo justo para colorear los núcleos.

Se vuelve a lavar con alcohol clorhídrico:

Ácido clorhídrico	0,25 ml.
Alcohol	70 »

Se lava con agua. Después de que aparece la coloración azul, se tiñe durante algunos segundos con una solución alcohólica de eosina al 0,5 por 100 en alcohol de 50°.

Se lava con alcohol absoluto. Se aclara con terpineol y se monta con bálsamo del Canadá.

Otro método consiste en colorear con una solución de picrocarmín, por ejemplo, el líquido de Certes:

Glicerina	1 ml.
Agua	1 »
Picrocarmín	1 »

Se pone una gota de este líquido en el borde del cubreobjetos. Por el lado opuesto se absorbe el líquido con un poco de papel secante.

La corriente de líquido así provocada permitirá la introducción del colorante entre las dos láminas de vidrio, tiñéndose así los elementos que éstas contienen. Puede sellarse la preparación para conservarla un tiempo determinado.

Un método bastante empleado es el de la nigrosina. (Figs. 5 y 6.)

Se pone sobre el porta una gota de agua que contenga la mayor cantidad posible de infusorios.

Se le añade una gota de nigrosina en agua al 10 por 100. Se mezclan los dos líquidos. Se seca la mezcla al aire y se monta con bálsamo después de desecada completamente. Algunas especies no soportan la desecación y estallan cuando ello ocurre.

INFUSORIOS

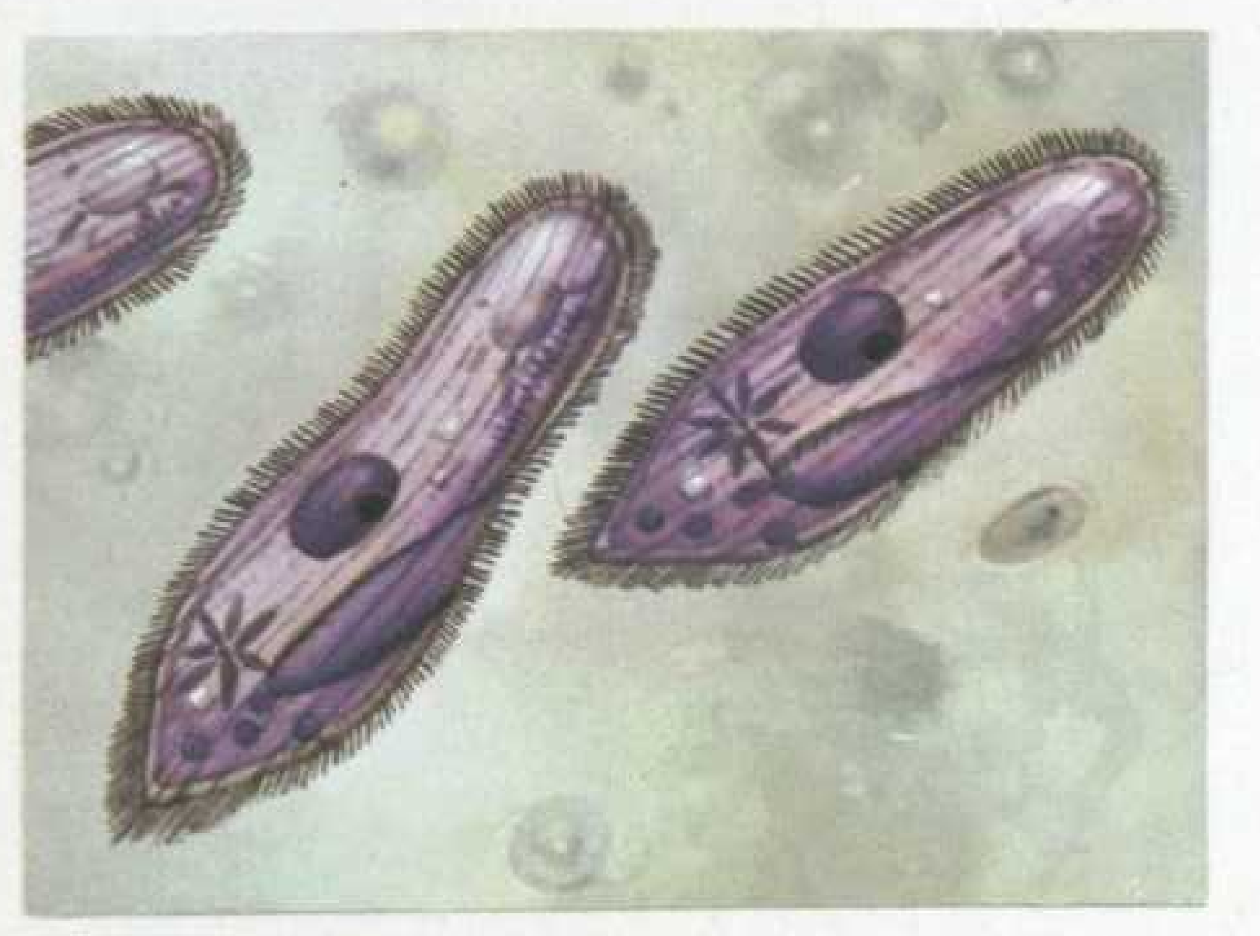
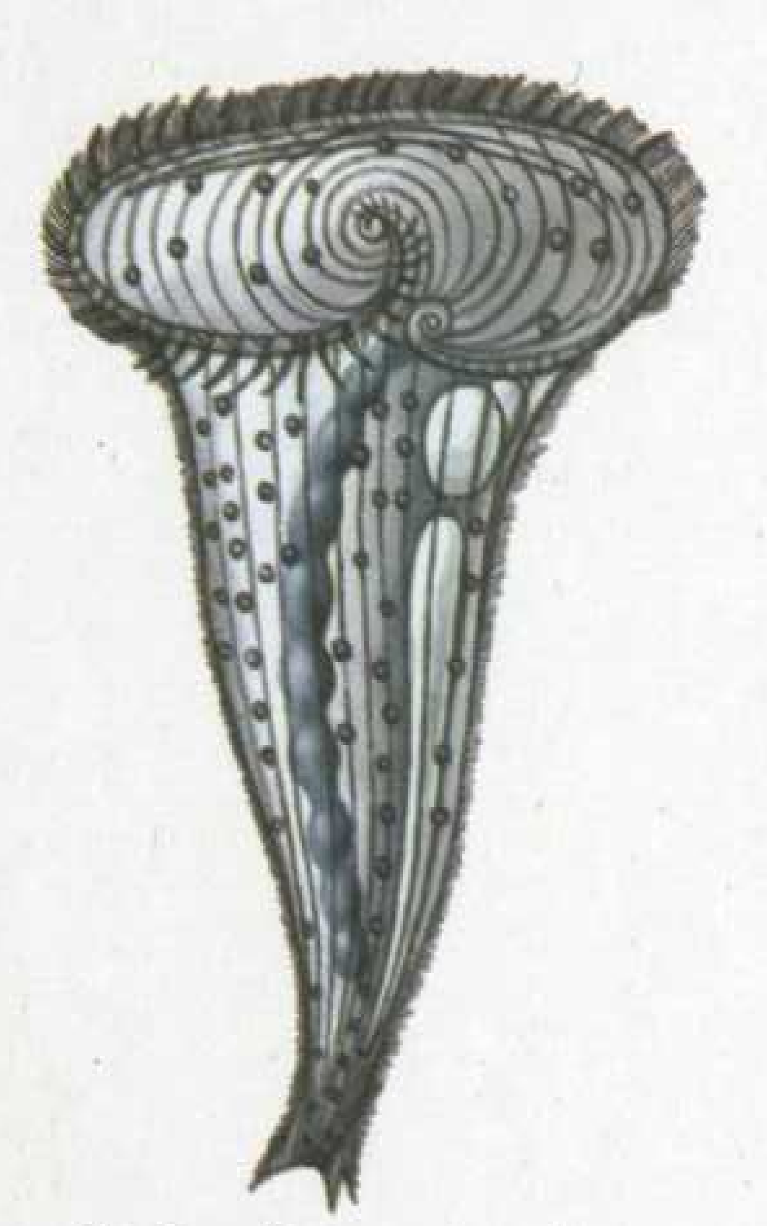
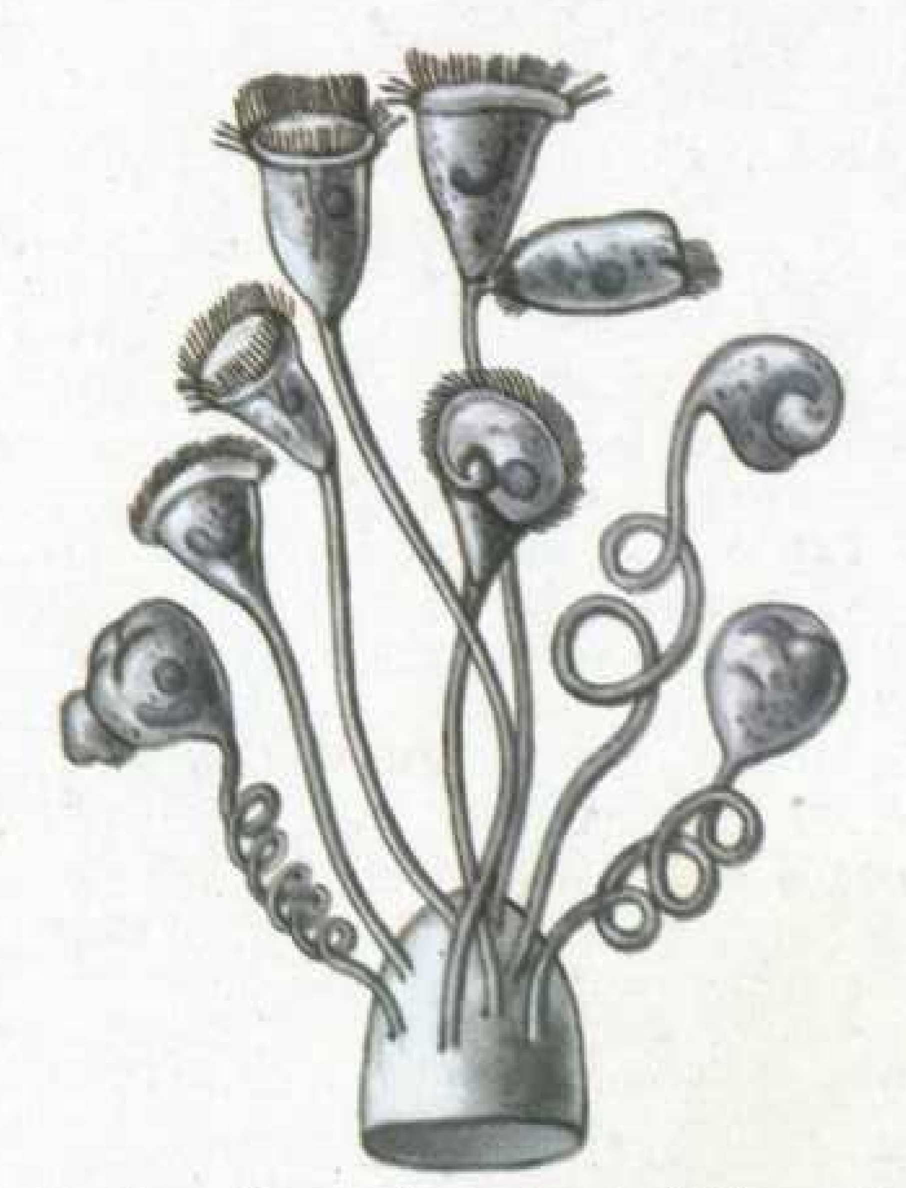
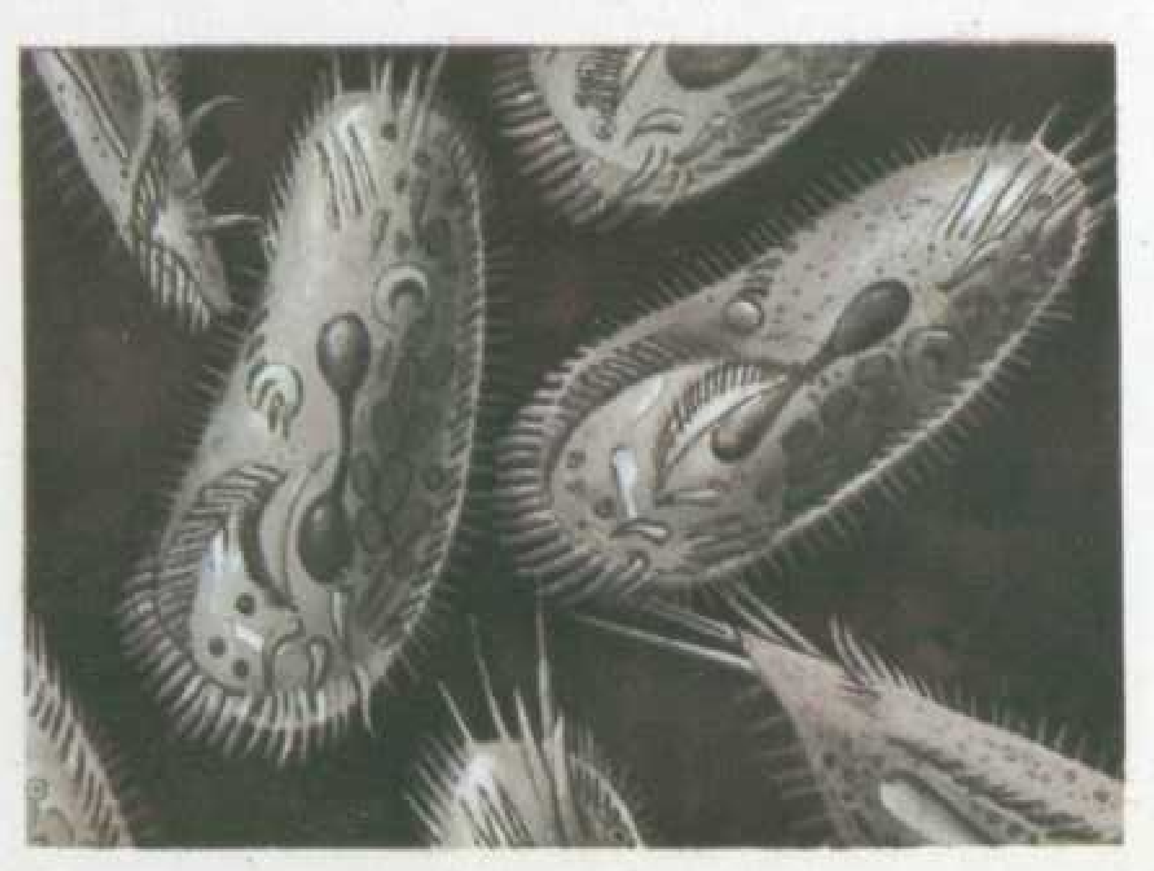
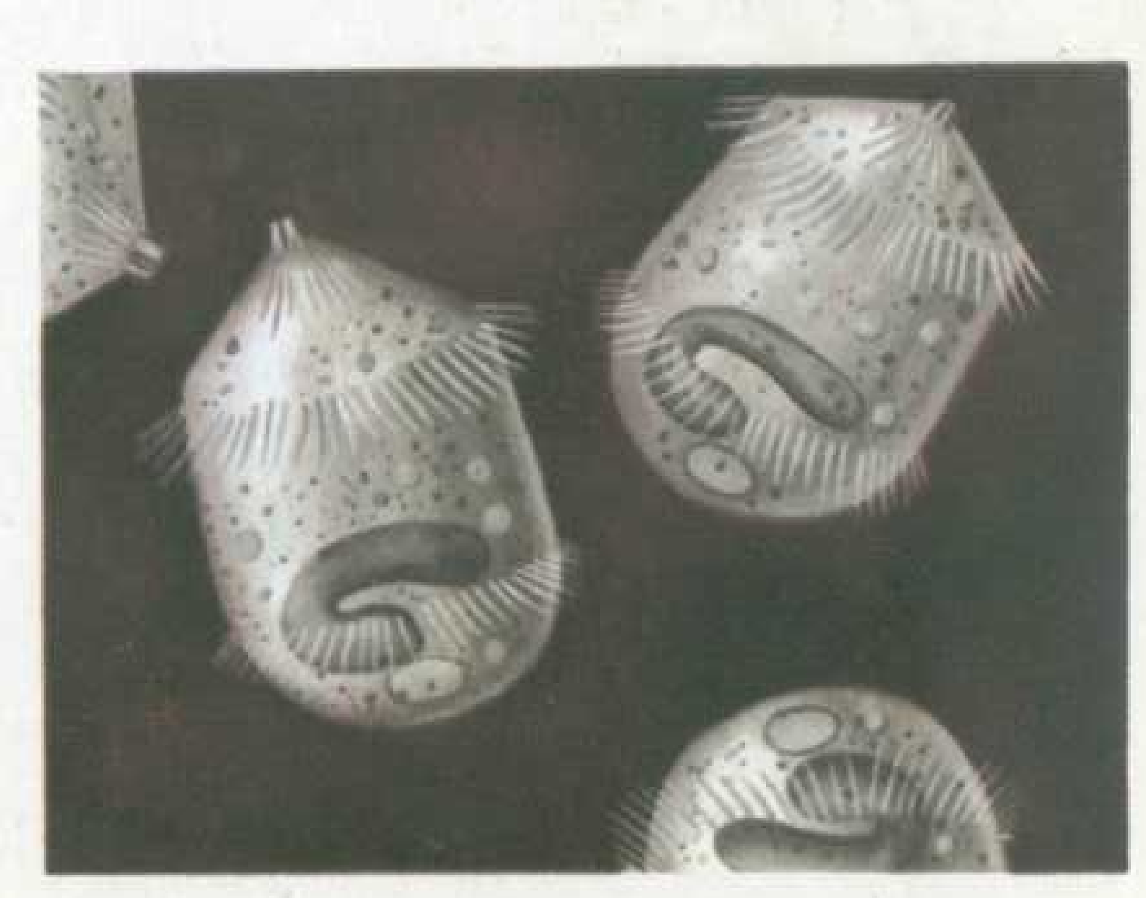

Fig. 1. — *Paramecium caudatum*, en preparación teñida.


Fig. 2. — *Opalina ranarum*


Fig. 3. — *Stentor polymorphus*.


Fig. 4. — Grupo de varios individuos de *Vorticella nebulifera*


Fig. 5. — Varios individuos de *Stylonychia mytilus*. Tinción por la nigrosina.


Fig. 6. — *Didinium*. Tinción por la nigrosina.

ROTÍFEROS

Animales acuáticos con simetría bilateral, no metaméricos, de forma alargada, corta o redondeada.

Cuerpo cubierto por un revestimiento cuticular y, en algunas especies, rígido (loriga). La cabeza no está diferenciada del cuerpo. Algunas especies tienen pie (dedos) o disco adhesivo.

Recolección. Se emplea una red de doble malla (fig. 1), la primera más ancha que la segunda, y terminada ésta en un frasco para la recogida de los Rotíferos planctónicos. Entre las algas y los musgos es muy fácil hallarlos viviendo casi epífitos; por ejemplo, *Philodina.* (Fig. 2.)

Técnica de observación

Pueden observarse en vivo por el método de la gota pendiente o, simplemente, entre porta y cubre.

Para efectuar una preparación duradera de los Rotíferos, se la debe fijar y teñir, aunque previamente será preciso narcotizarlos con una solución adecuada, para evitar que se contraigan, pues estos organismos son muy contráctiles y delicados. Líquido narcotizador de Beauchamp:

Clornidrato de cocaína . .	1 gr.
Alcohol etílico	10 ml.
Agua destilada	10 »

La cantidad de líquido que ha de añadirse depende de la de líquido que contenga los Rotíferos. Deben hacerse varias pruebas: si se contraen, se diluye el líquido narcotizador. Una vez inmóviles, se añade fijador, que puede ser el líquido de Fleming.

Una vez fijados, se pueden conservar en una solución de formol al 5 por 100, o bien montar en gelatina glicerinada, utilizando un porta en el cual se habrá previamente colocado un recuadro de papel de filtro empapado en glicerina. Éste constituirá una cámara, que se rellenará con la gelatina glicerinada que contiene los Rotíferos. Se tapará la preparación con el cubre y se barnizarán sus bordes para que quede herméticamente cerrada.

OLIGOQUETOS

Son gusanos cilíndricos metamerizados, de tamaño variable, de un milímetro a varios centímetros. Hay especies acuáticas, que viven en el limo del fondo (Tubifícidos), de donde pueden recogerse con un tubo apropiado. Los Tubifícidos son gusanos que miden de 1 a 20 centímetros, de color rosado, muy transparentes y frágiles. Se estropean fácilmente al taparlos con el cubre, por lo cual es preferible fijarlos con alcohol diluido o alcohol sublimado y teñirlos con carmín bórico. Se montan en gelatina glicerinada o en bálsamo.

La lombriz de tierra, *Lumbricus terrestris* (fig. 3), abunda en los huertos y lugares húmedos. Para el estudio de sus tejidos y órganos se dejan los gusanos, durante unos días, en un cristalizador con papel filtro humedecido, a fin de que vacíen su contenido intestinal. Se cortan después en fragmentos, que se fijan durante 12 horas en alcohol sublimado y se lavan y pasan por alcohol de diversos grados, hasta alcohol absoluto, dejándolos una hora en cada uno de ellos. Inmediatamente después se tratan, durante una hora, con esta mezcla:

Cloroformo	3
Alcohol absoluto	1

Transcurrido este tiempo, se pasan los fragmentos a una cápsula con cloroformo puro, donde se dejan otra hora. Luego se sumergen en una solución de cloroformo saturado de parafina y se dejan 48 horas en estufa a 58° C. El cloroformo, evaporado, deja la parafina, que empapa los tejidos.

Se cortan a 12 micras de ancho y se tiñen con la hematoxilina férrica.

Otra especie muy interesante de gusanos oligoquetos son los Nais (fig. 4), muy abundantes en aguas dulces. Su tamaño oscila entre 1 y 10 milímetros.

Podemos recogerlos del fondo de charcas y estanques por medio de una pipeta. Como son muy transparentes, se les puede estudiar inmediatamente, encima de una gota de agua, en un porta. Son muy frágiles; por ello, al cubrirlos con el cubre, pueden romperse. Se pueden fijar con alcohol diluido. El zumo de limón los mata instantáneamente. Para fijarlos se recomienda el alcohol sublimado en caliente.

Sublimado	10 gr.
Alcohol absoluto	100 ml.
Agua destilada	100 »
Ácido acético	2 »

Una vez fijados, se lavan y se colocan con el carmín bórico. Se montan en bálsamo.

Las especies que se hayan de incluir en parafina se fijarán en alcohol sublimado frío y se colorearán con hematoxilina férrica

Las espículas, una vez montados los Nais en bálsamo, quedan transparentes. Deben ser, pues, observadas y dibujadas con el gusano entre porta y cubre, ligeramente comprimido.

ROTIFEROS Y OLIGOQUETOS

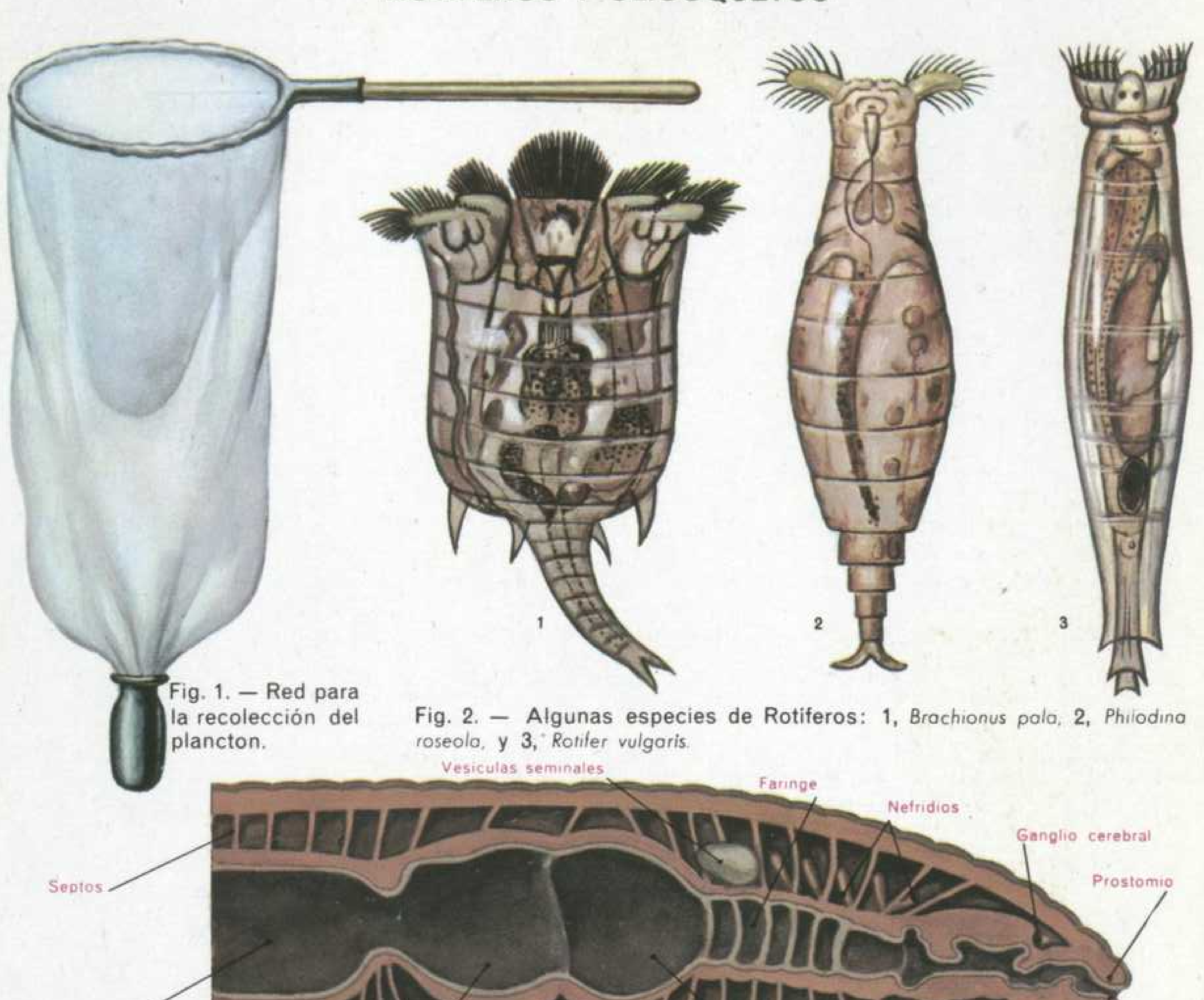


Fig. 1. — Red para la recolección del plancton.

Fig. 2. — Algunas especies de Rotíferos: 1, *Brachionus pala,* 2, *Philodina roseola,* y 3, *Rotifer vulgaris.*

Fig. 3. — Corte sagital del extremo oral de una lombriz de tierra *(Lumbricus terrestris)*

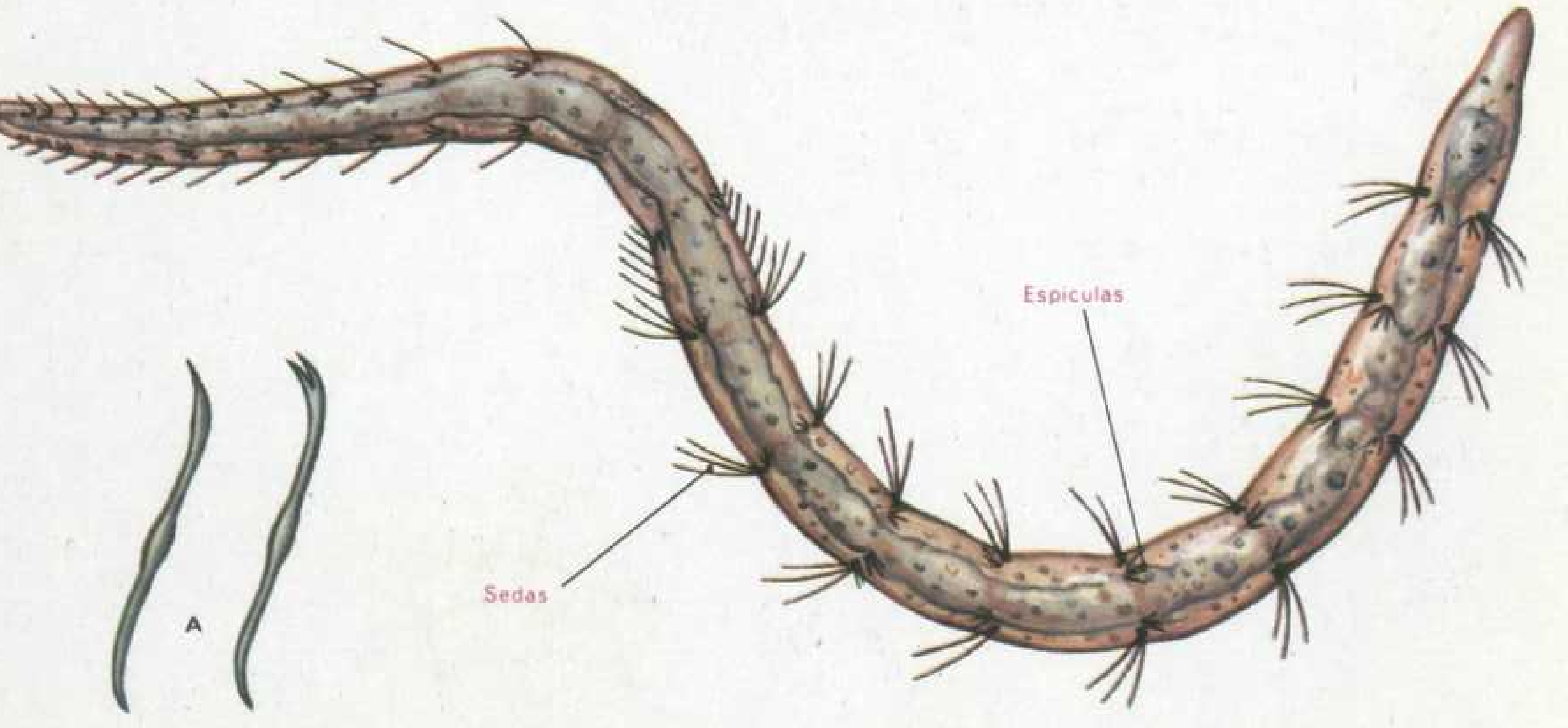


Fig. 4. — Oligoquetos. *Nais elinguis.* en A, detalle de las espículas.

ARTROPODOS

Característica común: exoesqueleto quitinoso articulado. Su tamaño es muy variado, desde los Crustáceos microscópicos, Copépodos (fig. 1), Cladóceros, Ostrácodos e Hidrocáridos, a los casi gigantes Coleópteros (fig. 3), que pasan de los 10 centímetros.

Los métodos de estudio han de adaptarse al tamaño del objeto que se va a estudiar; cuando se trata de insectos y otros animales de gran tamaño será preciso trocearlos y efectuar unas manipulaciones destinadas a hacer visibles sus tegumentos por transparencia o por iluminación lateral con lupas episcópicas, especiales para insectos clavados en alfiler. (Fig. 4.) Para los de tamaño muy pequeño se pueden utilizar los métodos generales de observación microscópica.

Los Artrópodos poseen, como hemos indicado, un exoesqueleto quitinoso que requiere un tratamiento especial para hacerlo transparente. Si con el clorofenol y las lejías sódicas y potásicas no se consigue aclararlo suficientemente, se puede emplear el permanganato potásico al 1 ó 2 por 1.000 durante 24 horas. Se lava la preparación durante unas horas con ácido oxálico al 1 por 300. El permanganato es un macerador enérgico que, empleado solo o en combinación con el alumbre, es un buen disociador de fibras córneas.

Los Insectos o fragmentos de ellos se sumergen en alcohol de 90º. Una vez, bien empapados, han descendido al fondo del recipiente, se retiran e introducen seguidamente en una solución acuosa de potasa cáustica al 10 por 100, donde se dejan varias horas o varios días, según el tamaño del insecto. Pasado este tiempo, se retira de la potasa el objeto y se baña en una solución de ácido acético al 30 por 100.

Cuando cesa el desprendimiento de burbujas, se saca el material y se sumerge unos minutos en ácido acético puro y, finalmente, en alcohol absoluto.

Puesto el insecto en la platina de una lupa binocular, haciendo presión con una aguja se logra que salga al exterior todo el contenido del cuerpo, en forma de un fluido grisáceo, quedando el tegumento limpio y transparente.

Si, a pesar de la presión, no se logra vaciarlo, se deja unas horas en la solución potásica. Si se calienta la solución potásica, el tiempo de acción se acorta considerablemente.

Algunos Artrópodos de tegumentos frágiles pueden tratarse con ácido acético, que tiene una acción aclarante muy suave. La operación puede llevarse a cabo con ácido más o menos diluido, y ya en frío, ya en caliente.

Limpios y aclarados ya los tegumentos, se pasan por xilol fénico y se montan en bálsamo. Una vez montados, y tapados con el cubre, se ejerce sobre éste, durante varias horas, una presión uniforme hasta que quedan totalmente secos. Con una hoja de afeitar se quita el bálsamo que desborda el cubre; éste se limpia con xilol.

Los Copépodos, Ostrácodos, Anfípodos, Isópodos y Cirrópodos y los estados larvarios de Crustáceos pueden tratarse con formol al 5 por 100 y pasarse por alcohol de 70º La coloración se hará con mucha prudencia, pues estas especies se sobrecolorean con facilidad. Generalmente se emplea una solución alcohólica de picrocarmín. Se aclaran con terpineol, se lavan con benzol y se montan en bálsamo.

Para preparar pequeños artrópodos de tegumentos débiles, como pulgones, pequeños ácaros (fig. 2), pequeñas moscas, ciertas larvas de malófagos, etcétera, los mataremos, introduciéndolos en una gota de alcohol. No es necesario pasarlos por el baño de potasa. Se tapan con el cubre; el peso de éste es suficiente para mantenerlos sujetos. Hay que procurar que la preparación no se seque.

Para observarlos mejor se pueden colorear con solución alcohólica de eosina. Para conservarlos, estos insectos se pueden montar en bálsamo o en gelatina glicerinada, siguiendo las técnicas generales.

Los pequeños pulgones, muy corrientes en ciertas plantas, se preparan matándolos con alcohol de 70º, pasándolos por alcohol absoluto y luego por éter sulfúrico, e introduciéndolos inmediatamente en la mezcla alcohol-ácido acético en frío. Cuando el animal está suficientemente transparente, se monta en gelatina glicerinada.

Una vez terminada, la preparación debe etiquetarse para evitar confusiones con otras preparaciones.

En Entomología es necesario estudiar el insecto entero (fig. 3), ya que, una vez estudiado, va a engrosar la colección, por lo cual no es necesario trocearlo. Para ello, una vez disecado, introduciéndolo en vapor de cianuro o en un frasco con fragmentos de corcho empapados en acetato de etilo, se clava el insecto en una aguja de entomólogo, de acero o de plástico. (Figura, 4, núms. 1 y 2.)

ARTROPODOS

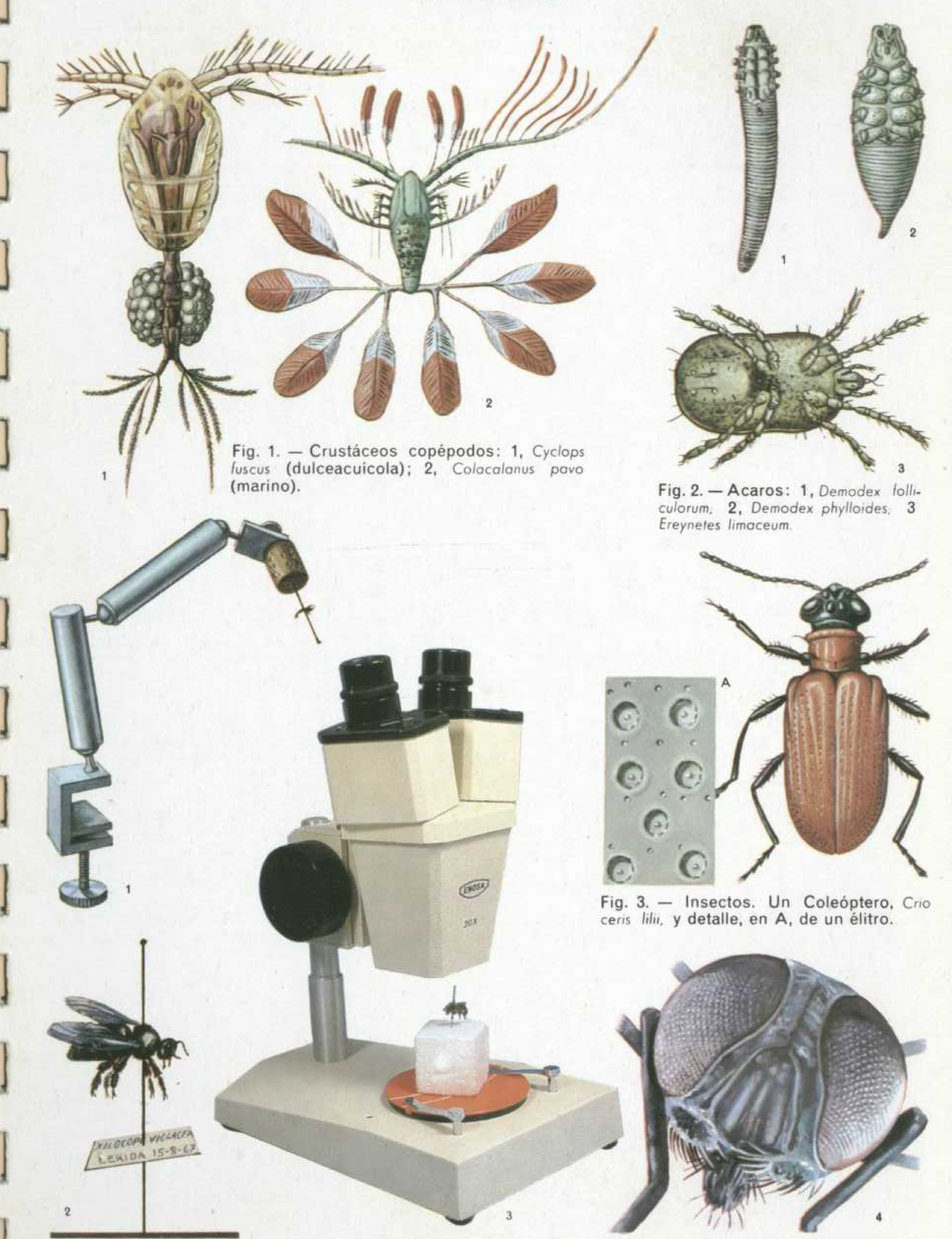


Fig. 1. — Crustáceos copépodos: 1, *Cyclops fuscus* (dulceacuícola); 2, *Colacalanus pavo* (marino).

Fig. 2. — Acaros: 1, *Demodex folliculorum*, 2, *Demodex phylloides*; 3 *Ereynetes limaceum*.

Fig. 3. — Insectos. Un Coleóptero, *Crioceris lilii*, y detalle, en A, de un élitro.

Fig. 4. Aparatos para el estudio de insectos disecados. 1, aparato de Sergent; 2, abejorro negro en un alfiler; 3, estereomicroscopio, y 4, cabeza de mosca, aumentada, vista de frente.

HISTOLOGÍA

Es la ciencia que estudia los tejidos de animales y plantas. En Histología es de suma importancia el microscopio, que pone de manifiesto los constituyentes de los diversos tejidos. Todos los elementos que se han de estudiar necesitan manipulaciones que los hagan más aptos para la observación y hagan visibles estructuras y detalles que no podrían ser apreciados sin realizarlas. Es preciso, primero, reducir los tejidos a pedazos lo suficientemente pequeños para permitir fijarlos, incluirlos o teñirlos antes de ser montados para su observación. (Figs. 1-6.)

Veamos algunos casos.

TEJIDO MUSCULAR

Se cortan los músculos en pequeños fragmentos de un centímetro de grosor aproximadamente, que se sumergen, durante 48 horas, en una cápsula con líquido de Bouin.

Se lavan durante largo tiempo, usando un frasco que permita pasar el agua continuamente sin que los fragmentos de músculo se salgan de él. Este lavado durará de 6 a 12 horas.

Se introduce el fragmento de músculo, durante 48 horas, en una solución de goma arábiga. Pasado este tiempo, se saca el músculo de la goma y se sumerge en alcohol absoluto por espacio de 24 horas. La goma se coagula y confiere al fragmento de músculo una consistencia córnea.

El músculo así preparado se incluye entre dos pedazos de corcho y seguidamente se procede a obtener los cortes. Éstos podrán ser en sentido longitudinal o transversal. (Figs. 1 y 2.) Es conveniente practicar cortes en ambos sentidos para obtener mejor información sobre su estructura. Los cortes se pueden practicar con un micrótomo de mano o simplemente con una afilada hoja de afeitar.

Los cortes así obtenidos se ponen en un cristalizador con agua, a fin de que suelten la goma que los empapaba. Una vez libres de la goma, se ponen en un porta, con una gota de agua o glicerina y se tapan con un cubreobjetos.

Pueden teñirse con picrocarmín, depositando en el borde del cubre una gota de colorante, que se introduce por capilaridad. Otros cortes se tiñen, encima del porta, con hematoxilina acuosa; otros, en una cápsula, con hematoxilina-eosina. Todos los cortes se montan en glicerina, obteniendo así toda una serie de ellos que permitirán hacer un buen estudio del tejido.

Puede completarse este estudio aislando una fibra muscular. Se disocian con una aguja varias fibras, que se tratan con ácido salicílico durante tres o cuatro días, se lavan durante largo tiempo, se colocan encima de un porta y se colorean con hematoxilina eosina, según la técnica ordinaria. Se montan en glicerina.

Si se desea montarlos en bálsamo, los cortes se colocan encima del porta, fijándolos en él con agua gelatinada. Se colorean con hematoxilina eosina. Se lavan y deshidratan con alcoholes de 50, 70, 90° y absoluto. Se aclaran con esencia de lavanda, eliminando el exceso de esencia; se añade el bálsamo y se cubren.

TEJIDO NERVIOSO

Como objeto de estudio podemos usar el nervio ciático de una rana.

Fibrillas. Se separa totalmente el nervio del cuerpo de la rana. Se trata durante tres o cuatro horas con una solución de ácido ósmico al 0,5 por 100, la cual lo fijará. Se lava durante cuatro horas en agua destilada, se mete en una cápsula y se deja en alcohol de 90° durante 24 horas. Se disocia en fragmentos de cinco milímetros aproximadamente, que se tiñen, durante 12 horas, con una solución saturada de fucsina ácida en agua. Se incluyen en parafina y se hacen cortes de unas tres micras. Al observarlos al microscopio se ven las fibrillas en color rojo, y el plasma interfibrilar, incoloro.

Nervio. Se trata un fragmento de nervio como hemos indicado anteriormente, hasta el momento de teñirlo, reemplazando la tinción por una impregnación, durante 24 horas y en la oscuridad, de solución de nitrato de plata al 1 por 1.000.

Transcurrido este tiempo, se lava con agua destilada y se expone a la luz. Para observarla en el microscopio, se trata la preparación con glicerina y alcohol, y después con esencia de girasol, y se monta en bálsamo. Los nervios aparecerán como en negativo, muy visibles.

Disociación de la sustancia gris de la medula

Los fragmentos de medula fresca de cordero se ponen en una solución de alcohol al tercio durante 24 horas. Transcurridas éstas, se deposita un fragmento de medula encima de un porta y se tiñe con picrocarmín o bien con hemalumeosina, y se cubre. Las células mostrarán sus prolongaciones ramificadas. (Figs. 3 y 4.)



HISTOLOGIA

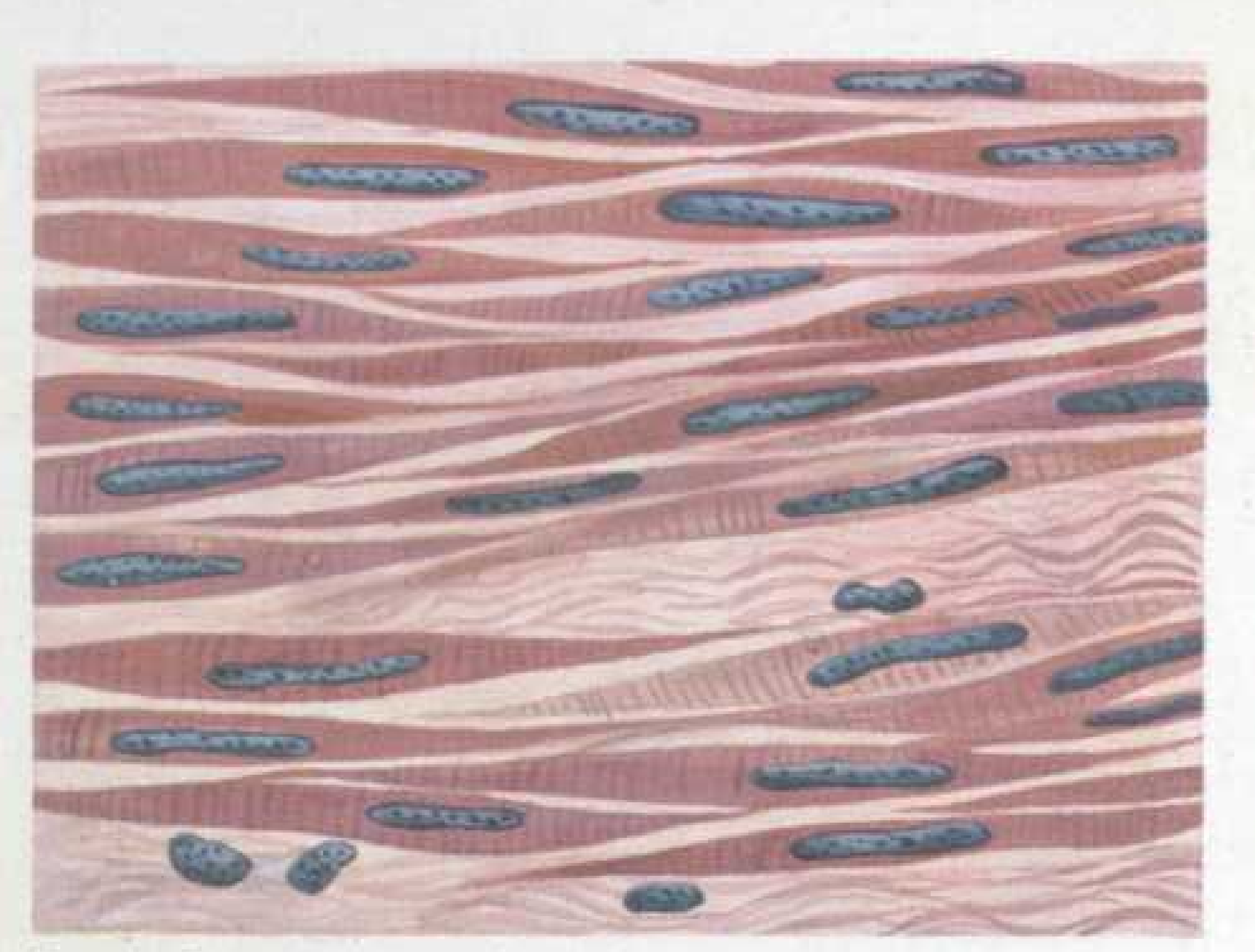


Fig. 1 - Sección longitudinal de un tejido muscular estriado.



Fig. 2. — Sección transversal de un tejido muscular liso.

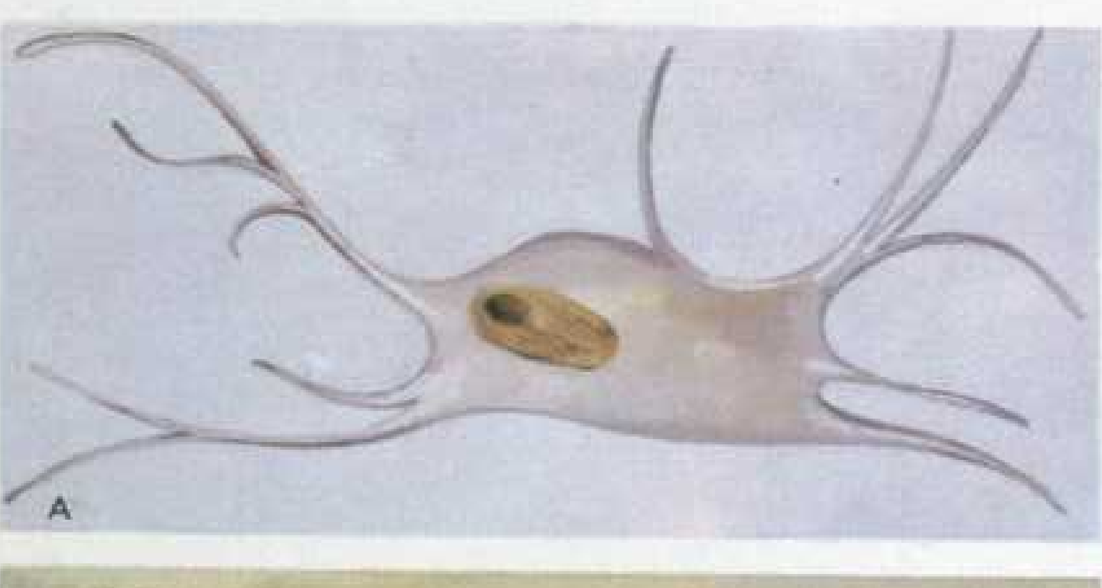




Fig. 3. — Célula nerviosa del carnero. En A, tinción por la hemaalumeosina, y en B, tinción por el azul policromo.



Fig. 4. — Corte de la médula espinal de un perro recién nacido.

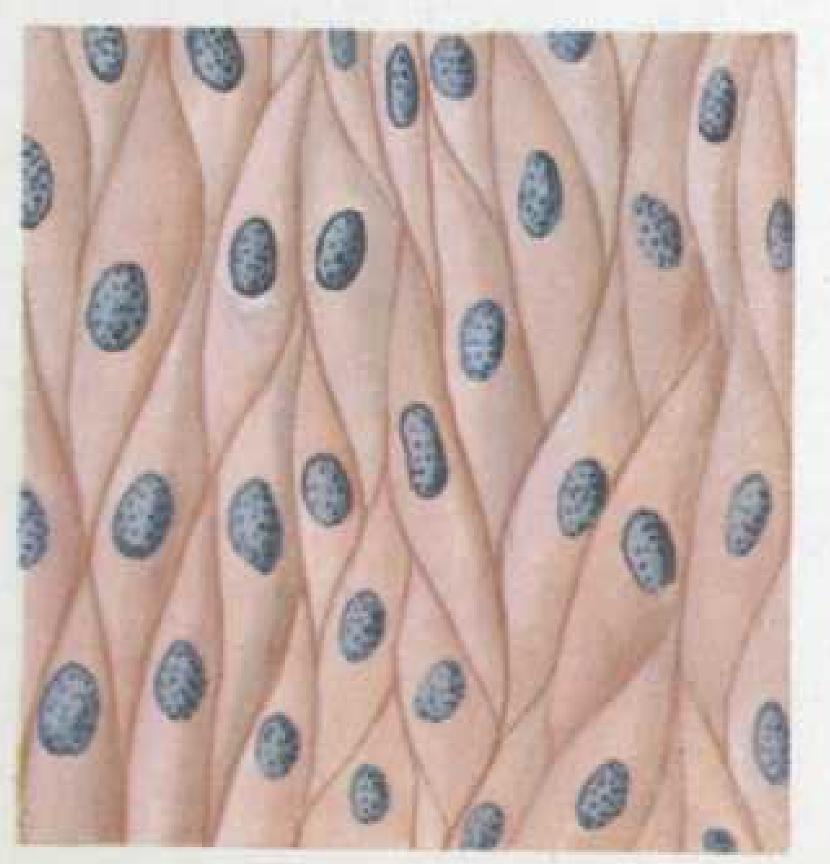


Fig. 5. — Tejido epitelial pavimentoso de la lengua del hombre.



Fig. 6. — Sección longitudinal de una raíz joven de cebolla. Se observan varias células en división mitótica.

HEMATOLOGÍA

EXAMEN DE SANGRE

El examen microscópico de la sangre se hace habitualmente por dos razones principales: para observar o contar los elementos celulares que la constituyen o para buscar elementos u organismos patógenos que no le sean propios. Para ambos casos puede examinarse la sangre en fresco, recién tomada, en gota pendiente o en extensión, o realizar una serie de manipulaciones para hacer evidente la existencia de células que, sin tinción, no serían distintas de otras en apariencia iguales.

Se empieza por hacer un frotis por extensión. Se deposita una gota de sangre en un extremo de un portaobjetos bien limpio y desengrasado. Con el borde del cubre, con una varilla de vidrio o con otro porta se toca la gota, que por capilaridad se correrá a todo lo largo del borde. Con la rapidez que se adquiere por la práctica, se extiende la sangre a lo largo del porta, procurando obtener una película lo más fina posible.

Una vez extendida, la sangre se seca al aire agitando el porta, nunca a la llama. Se fija con alcohol absoluto durante un minuto y se desecha el alcohol sobrante. Se seca, agitando el porta, y se tiñe mediante el método de Giemsa o por el de la hemalumeosina. (Fig. 1.)

Los glóbulos rojos, o hematíes, aparecen en color rosa pálido. Los leucocitos, o glóbulos blancos, con el núcleo azul oscuro. Entre los leucocitos distinguiremos unos poco o nada coloreados, otros teñidos más o menos uniformemente de color violeta rosado y otros con el protoplasma francamente rojo.

Si observamos más atentamente, veremos que esta coloración fuerte es debida a gran número de granulaciones de color rojo intenso, redondeadas y muy próximas entre sí. Se trata de un leucocito eosinófilo, así designado porque su protoplasma es muy sensible a la eosina. En la sangre normal este elemento es siempre polinuclear, a diferencia de aquellos que poseen un núcleo redondeado, oval, alargado, y que son los mononucleares. En realidad, los polinucleares tienen también un solo núcleo, pero éste, a consecuencia de las estrangulaciones, toma en apariencia el aspecto de pluralidad. (Fig. 2.)

Los leucocitos que no toman bien el colorante se llaman neutrófilos.

La proporción entre leucocitos y glóbulos rojos es de uno de los primeros por 600 u 800 de los segundos. Siempre que las cifras se alteren en la proporción de mononucleares, polinucleares y eosinófilos, o en la relación antes indicada, hay una alteración patológica.

El número de leucocitos en sangre se mide tomando por unidad la cantidad de ellos contenidos en un milímetro cúbico, que es en un hombre adulto normal de 6.000 a 8.000. Esta cantidad puede alterarse con la edad o por enfermedad.

En cuanto a los glóbulos rojos, su número normal en un hombre adulto es 5.000.000 por milímetro cúbico.

Al igual que la de los leucocitos esta cifra puede alterarse por la edad o por causas patológicas.

La fórmula leucocitaria se establece con objetivo de inmersión en la extensión teñida con hemalumeosina o Giemsa, recorriendo el número de campos necesario y haciendo el recuento de cada variedad de elementos. Cuando se llega a un total de 100, se mira la cifra que corresponde a cada variedad y queda establecida la fórmula. Es evidente que si contamos varios centenares y determinamos el término medio, el resultado será más exacto.

Para el recuento de los glóbulos rojos se utilizan unos aparatos llamados hematímetros, que, en esencia, consisten en un porta con un retículo muy finamente dividido y tapado con un cubre, en el que, en un recuadro, queda dentro del retículo una cantidad de sangre igual a una centésima de milímetro cúbico. (Figs. 3 y 4.) Existen muchas variedades de retículos: los de Malassez, Hayem, Agasse-Lafont, etc., que, con ligeras variaciones, tienen el mismo fundamento.

Tanto para la conservación como para la dilución, si es necesaria, de los glóbulos rojos y de los leucocitos sirve el líquido de Hayem (líquido A):

Cloruro sódico anhidro.	1	gr.
Sulfato sódico	5	»
Bicloruro de mercurio .	0,50	»
Agua destilada	200	ml.

El líquido de Hayem B) hemoliza los glóbulos rojos y se emplea para el examen y recuento de los leucocitos, a los cuales, además, tiñe.

Está compuesto por:

Acido acético	0,50	gr.
Solución alcohólica de azul de metileno . .	1	ml.
Agua destilada	100	»

Para la investigación de elementos anormales en la sangre, bacterias, parásitos, etc., se emplean los métodos de tinción ya descritos anteriormente. También pueden emplearse los métodos en fresco, de gota pendiente, etc.

HEMATOLOGIA

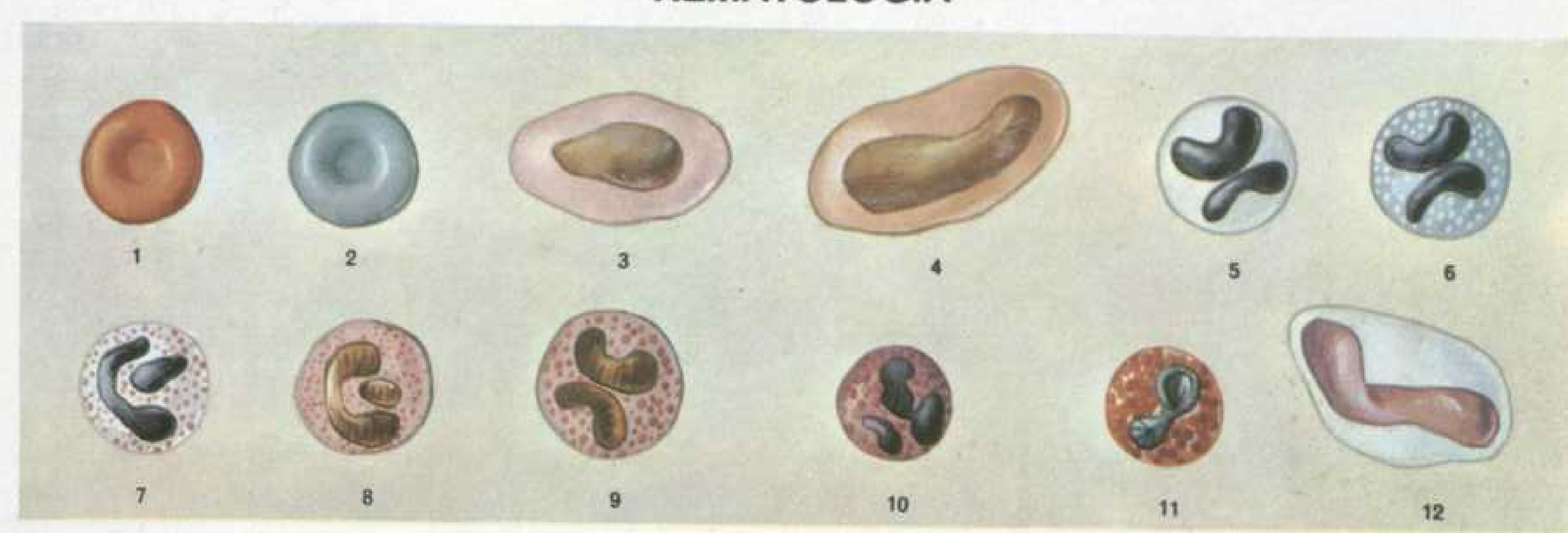


Fig. 1. — Elementos figurados de la sangre humana: 1 y 2, hematíes; 3 y 4, linfocitos; del 5 al 10, polinucleares, siendo el 5 neutrófilo, el 6 eosinófilo y el 7 basófilo; 11, leucocito eosinófilo; 12, monocito. Tinciones: 1, hemateinaeosina; 2, 5-7, azul policromo; 3, 4, 8-12, Giemsa.

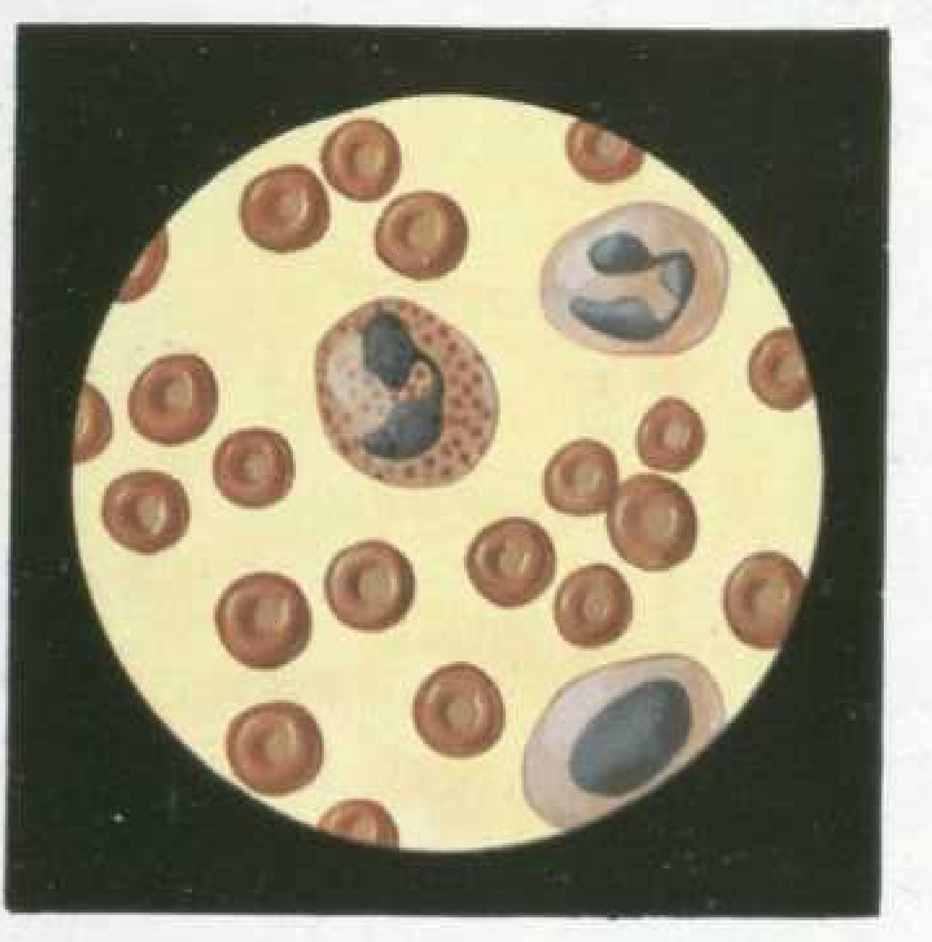


Fig. 2 – Sangre normal. Doble tinción por la hemalumeosina.

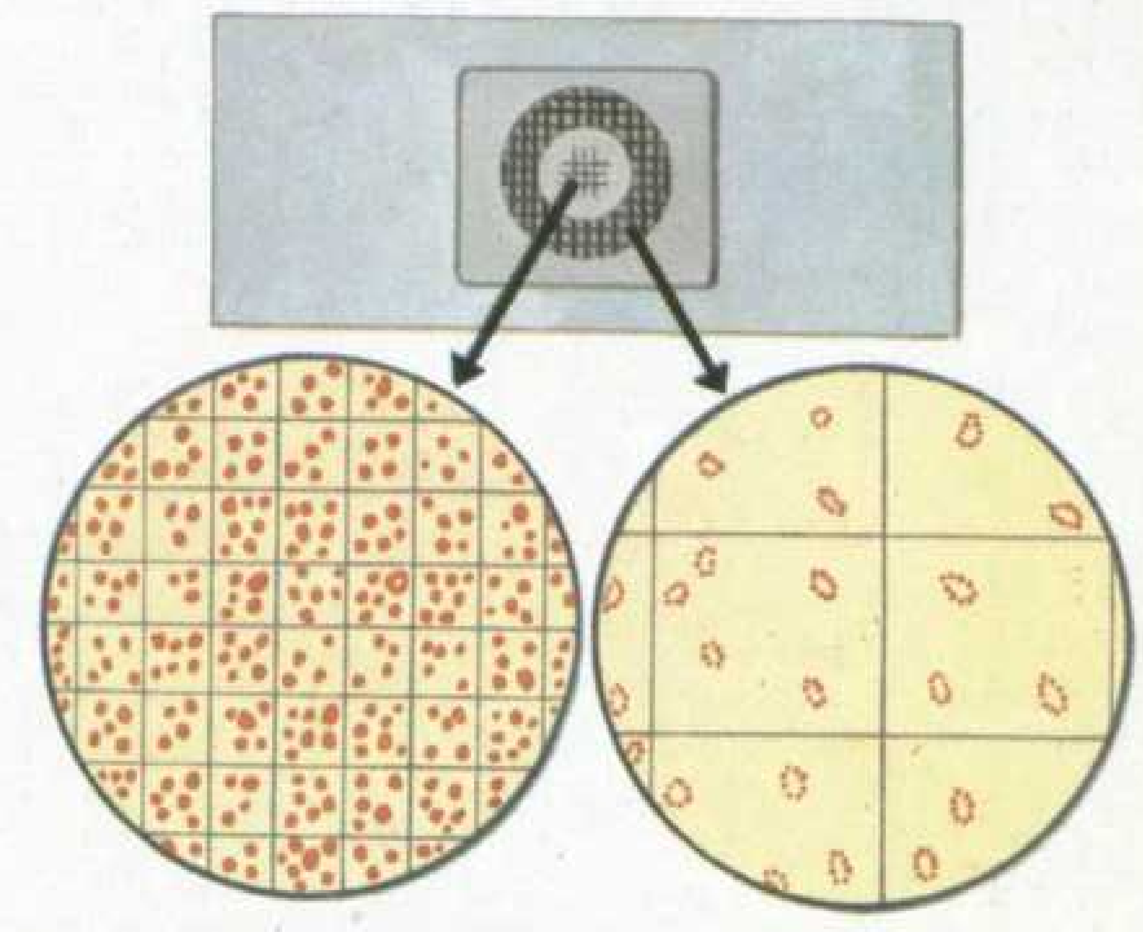


Fig. 3. — Célula de Agasse-Lafont. Cuadrícula central: 1/1000 de mm³; cuadrícula periférica: 1/10 de mm.³

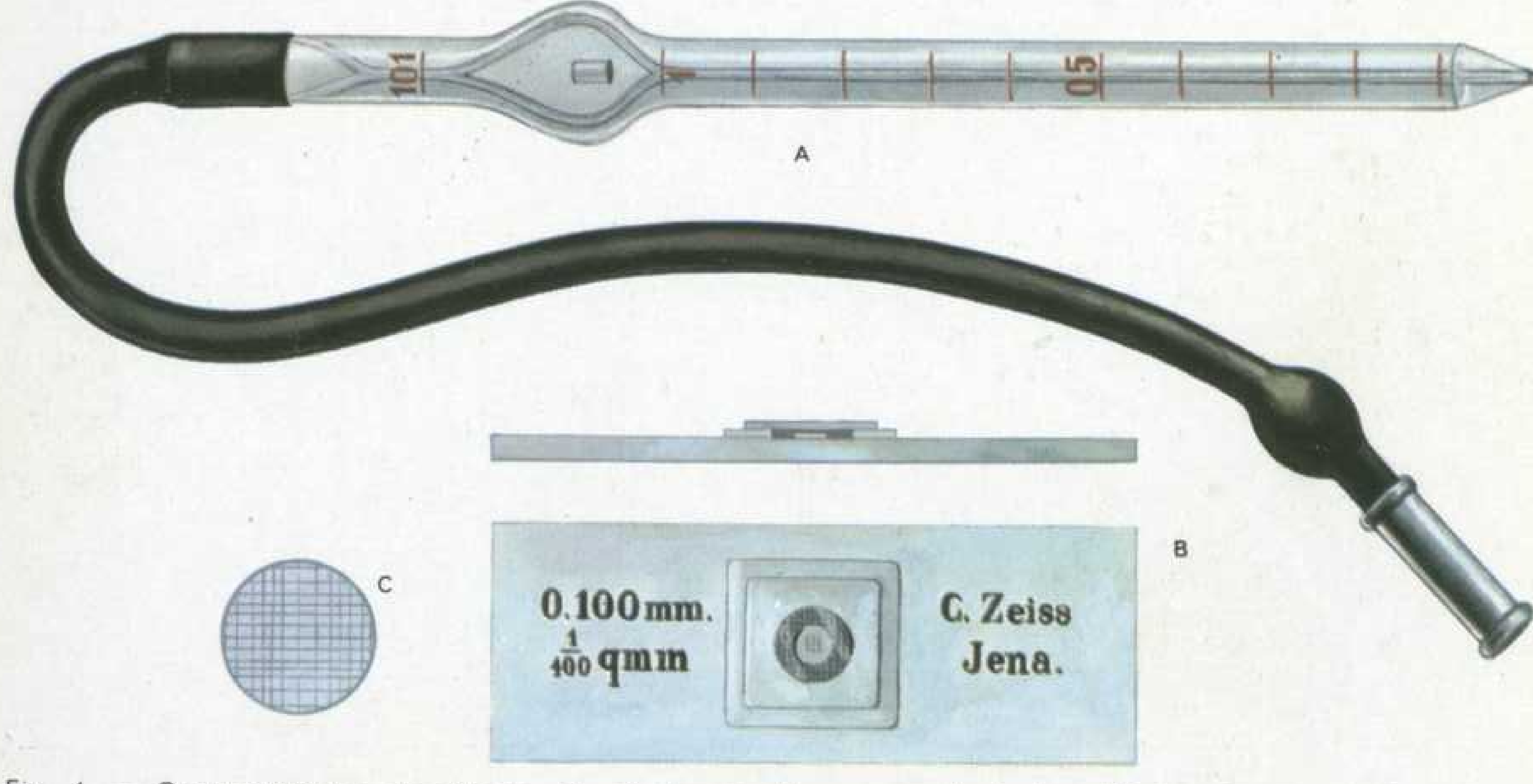


Fig. 4. — Cuentaglóbulos de Thoma. A, pipeta para toma y mezcla de los glóbulos; B, célula, y C, retículo grabado en el fondo de la célula.

PETROGRAFÍA

PETROGRAFÍA MICROSCÓPICA

En Petrografía son indispensables, para el estudio completo de una roca, secciones delgadas (figs. 3-5), aunque no siempre puedan proporcionarnos toda la información necesaria.

Las secciones delgadas no son adecuadas cuando las rocas son de grano muy grueso y de composición variable, como sucede con los conglomerados, brechas y pegmatitas.

Para la preparación de una sección delgada, normalmente los ejemplares se cortan con una sierra circular provista de diamantes, empleando como lubricante agua y petróleo. (Fig. 1.) Se traza el contorno de un portaobjetos sobre una placa de la roca, que se corta con la sierra por dentro de las líneas marcadas.

La superficie que ha de ser montada sobre el portaobjetos debe ser completamente plana; para lograrlo se la desgasta frotándola sobre un disco giratorio de fundición y empleando una suspensión en petróleo de carborundo de silicio.

Una vez plana, se lava para quitar los restos de abrasivo. Con un poco de práctica se pueden lograr secciones de 0,08 milímetros de espesor.

Para pegar la sección al porta se puede emplear el cemento termoplástico Lakeside número 70, que reúne una serie de condiciones: ser insoluble en lubricantes que contengan petróleo y fácil de desgastar y aplicar, tener gran resistencia, y fundir a 140°. Se vende en barras, y sólo es necesario frotar una de ellas contra el portaobjetos y la sección de roca y calentar ambos a 140° en placa caliente, evitando el sobrecalentamiento y la formación de burbujas. Si no llegara a esta temperatura, su viscosidad sería demasiado pequeña, no se lograría una película uniforme y, en este caso, no serían paralelas las caras del vidrio y la sección de roca.

Una vez pegada, se desgasta la sección, por frotamiento en disco de fundición o de vidrio con un abrasivo en suspensión en petróleo, hasta lograr secciones de 0,03 milímetros. (Fig. 2.)

Una vez preparada, la sección se monta en bálsamo, y se calienta éste a 110° C para no fundir el Lakeside. Se calienta también el cubreobjetos. Se deposita una gota de bálsamo caliente encima del cubreobjetos, que se apoya en un borde del porta y se deja caer por su propio peso. Se coloca un peso encima del cubre para expulsar el bálsamo sobrante.

Los ejemplares deleznables deben impregnarse, antes de ser cortados, con sustancias apropiadas que les confieran dureza y agregación suficientes para permitir las manipulaciones antedichas. Estas sustancias pueden ser monómeros de la lucita (metacrilato de metilo) bálsamo del Canadá, calolita, baquelita con n = 1,64, aunque estas últimas son muy viscosas y necesitan disolventes cuya evaporación produce burbujas dentro del ejemplar. La mejor sustancia es, pues, la lucita impregnada al vacío. Otra sustancia muy empleada es el «aroclor» 4.465, de baja viscosidad, que impregna rápidamente los materiales deleznables, por capilaridad y sin disolventes.

Las secciones de rocas que contengan yeso no pueden calentarse demasiado; de hacerlo, se formaría sulfato cálcico semihidratado. Las secciones de rocas que contengan sales solubles en agua deben cortarse en seco. Los minerales delicuescentes se han de conservar en cloruro cálcico.

Tinción

Cuando una roca contiene dos o más especies minerales que ópticamente parecen similares, puede ser conveniente teñir las secciones delgadas antes de cubrirlas; en la práctica, solamente se hace la tinción en unos pocos casos concretos.

Procedimiento para nefelina-plagioclasa

Se extiende durante cuatro minutos ácido clorhídrico sobre la sección. Se lava con agua, por inmersión. Se extiende con pipeta una solución de verde malaquita durante un minuto y se seca al aire. Se somete durante 45 segundos a la acción del ácido fluorhídrico. Se introduce la sección en una solución de cobaltonitrito sódico (1:2) durante dos o tres minutos y se lava con agua.

El feldespato queda teñido en amarillo; la plagioclasa, sin teñir, y la nefelina, en verde.

Procedimiento para brucina-serpentina y dolomita-calcita

Se sumerge durante tiempo más o menos largo la sección en ácido clorhídrico diluido, en el cual se habrán disuelto unos cristales de ferrocianuro potásico. La brucita se tiñe de azul, y la serpentina, de verde pálido.

Se lava con cuidado y se sumerge en solución Lemberg por un minuto.

Solución Lemberg:

Extracto de campeche . .	6 gr.
Cloruro de aluminio . . .	4 »
Agua	60 »

Se lava bien. La calcita se tiñe de lila, y la dolomita no se altera.

PETROGRAFIA

PETROGRAFIA MICROSCOPICA

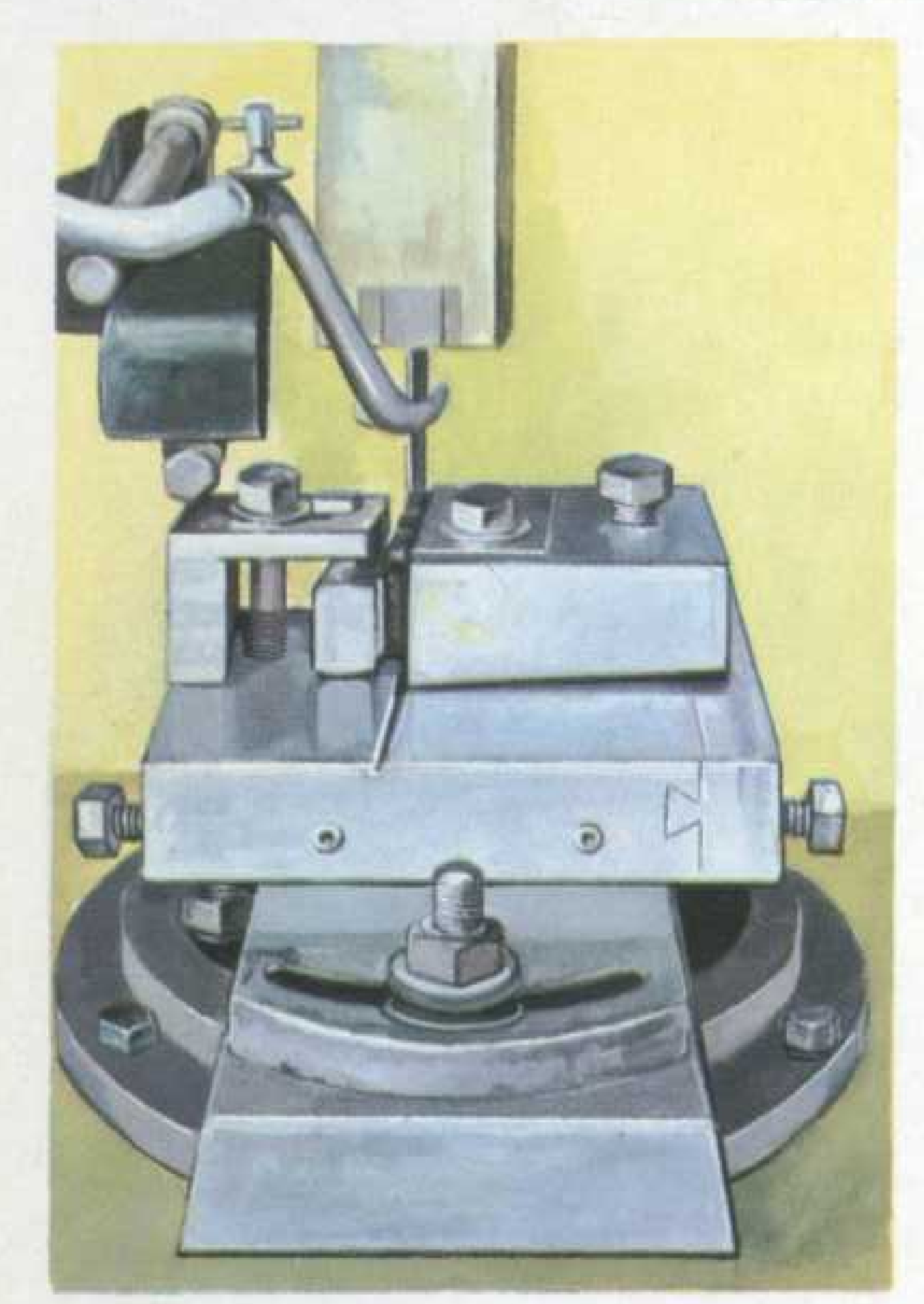


Fig. 1. — Sierra de diamante para obtener secciones delgadas de rocas.

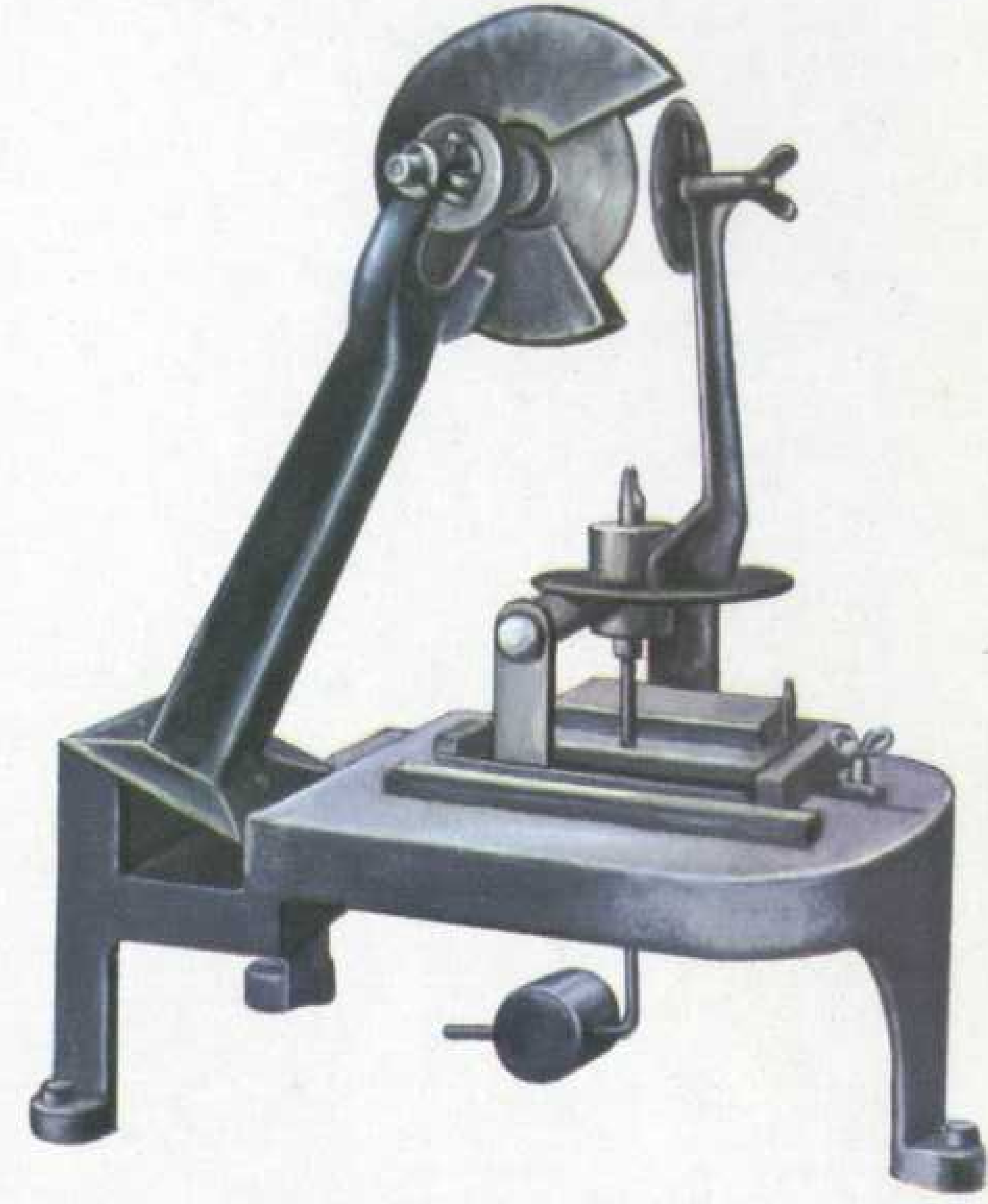


Fig. 2. — Máquina de Winkel para cortar rocas.



Fig. 3. — Micrografía de un basalto. Luz polarizada.



Fig. 4. — Micrografía de un gabro. Luz polarizada.

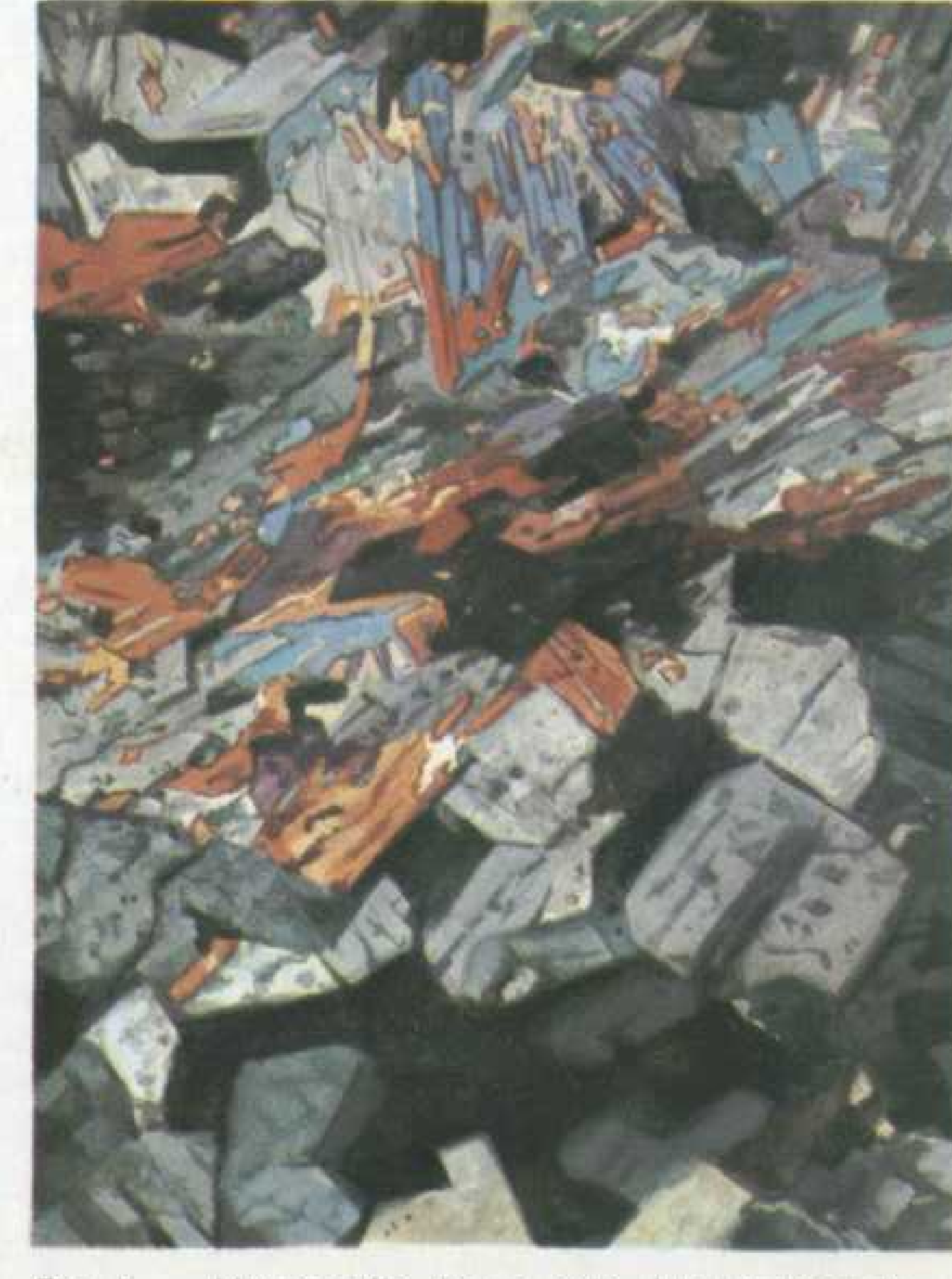


Fig. 5. — Micrografía de un neis. Luz polarizada.

ANÁLISIS MICROMÉTRICO MINERALÓGICO

Para examinar y determinar la composición mineralógica de una roca se emplea el método lineal de análisis micrométrico, conocido también por método de Rosiwal, con arreglo al cual se coloca la preparación sobre la platina de un micrómetro registrador fijado en la platina del microscopio. El micrómetro está provisto de cinco o seis tornillos, a cada uno de los cuales se asigna un mineral o grupo de minerales. El carro que contiene la preparación se mueve a través del campo visual, haciendo girar cada uno de los tornillos cuando el mineral o el grupo de minerales que se le ha asignado atraviesa la línea observada. Los tornillos tienen cabezas micrométricas, de modo que, una vez observada toda una línea transversal de la preparación, se puede leer directamente y anotar la distancia total examinada al ir cruzando el campo visual los granos de cada especie o grupo mineral. Los tornillos micrométricos se vuelven a su posición cero, se desplaza la preparación una distancia determinada y se repite la operación con la línea siguiente.

El análisis completo consiste en una serie de líneas transversales paralelas en cuyo recorrido se ha totalizado la longitud de las líneas cruzadas por los granos minerales de las diferentes especies para cada una de dichas especies o grupos.

El micrómetro registrador de Hunt-Wentworth (fig. 1, A) es uno de los más utilizados; está dotado de cinco tornillos micrométricos, todos a un mismo lado.

Otro instrumento, construido por Leitz, tiene seis tornillos, tres a cada lado. (Fig. 1, B.)

MÉTODO DE INMERSIÓN

Puede aplicarse al estudio de especies en agregados formados por un solo mineral y a la medida de sus constantes ópticas, y también al estudio microscópico de rocas y agregados poliminerales. Para determinar sus constituyentes esenciales, las rocas y los agregados se triturarán, lo cual permitirá estudiar con éxito la mezcla pulverulenta. El estudio de los fragmentos triturados ayuda no sólo a identificar los minerales y las rocas, sino también a medir sus índices de refracción, operación que no puede llevarse a cabo en una sección delgada. Para ser observados al microscopio, se introducen estos fragmentos en agua o en aceites o esencias. Igualmente pueden ser montados en bálsamo, siempre que así se prefiera.

Una variante de este método es el empleado para determinar los residuos insolubles de calcitas y rocas carbonatadas y salinas.

Se tratan éstas previamente con ácido clorhídrico a una dilución de 50 por 100. No obstante, si se pretende conservar estructuras fosilíferas, es preciso emplear ácido acético. En general, basta con dos o tres ataques, lavando y decantando para recoger el residuo, que se examinará en inmersión.

EXAMEN CON EL MICROSCOPIO BINOCULAR

Con este microscopio, llamado también estereoscópico (fig. 1, C), pueden observarse los cortes o minerales en luz incidente u oblicua en relieve.

Básicamente se trata de dos microscopios unidos, inclinados, con pie soporte, espejo de iluminación o lámpara platina y tubo binocular de enfoque común. La platina consta de un orificio circular para las placas portaobjetos, y sus partes laterales van provistas de ganchos en que se fijan apoyos para los brazos.

Con este aparato podemos obtener información sobre el color, características texturales, calibre y tamaño, forma y rodadura de los granos, e identificar rocas y fósiles.

OTROS MÉTODOS

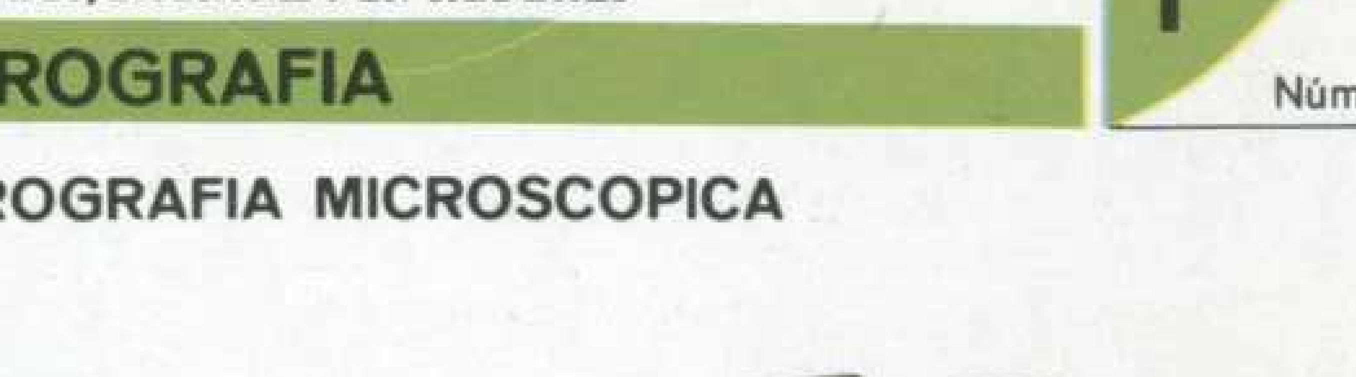
Podemos también emplear un microscopio petrográfico y metalográfico provisto de dispositivo de polarización. El polarizador va colocado debajo del condensador para observaciones por transparencia, y en el iluminador vertical, si se observa por incidencia.

El analizador va colocado debajo de los tubos portaoculares. (Fig. 2.)

Las secciones observadas con luz polarizada ponen de manifiesto detalles de estructura y diferencian elementos que con luz normal no son diferenciables. Se emplea en Metalografía para el estudio de aleaciones y metales.

En estos microscopios la platina y el nicol analizador deben ser móviles alrededor de su eje; este último debe tener un cuadrante graduado.

Ha de emplearse luz intensa de 1.000 a 1.500 bujías. Por rotación de la platina, los fenómenos cromáticos aparecen muy patentes. Las secciones deben estar exactamente perpendiculares al eje del microscopio.



PETROGRAFIA MICROSCOPICA

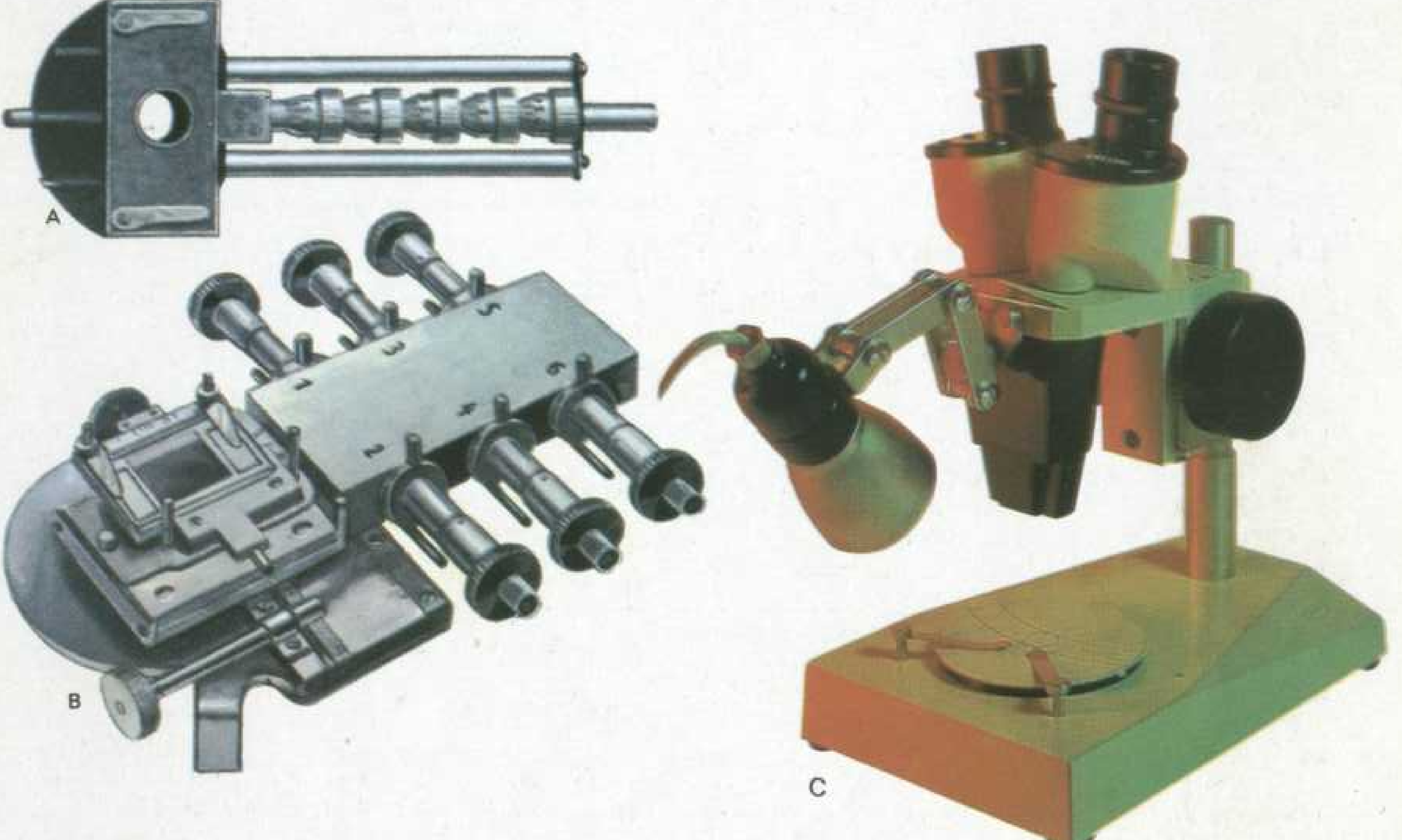


Fig. 1. — En A, micrómetro registrador de Hunt-Wentworth. En B, platina integradora de Leitz. En C, microscopio estereoscópico.



Fig. 2. — Microscopio metalográfico.

MICROPALEONTOLOGÍA

PALEOZOOLOGÍA Y PALEOBOTÁNICA

Técnicas

Aparte el método clásico de las láminas finas, empleado en Petrografía, no existe una técnica general, sino que cada caso debe ser resuelto según la composición química, la dureza, el tamaño, las rocas en las que está incluido, etc. Se empleará en todo caso el método de la lámina fina para obtener una primera información acerca de los detalles antes citados y de la riqueza de la muestra en microfósiles.

Lo más cómodo es obtener el mayor número posible de fósiles, y esto, generalmente, sólo se consigue separando los fósiles de la roca o material. Para lograrlo disgregaremos la roca mediante ácidos, mediante calor o con el método de las soluciones concentradas, basado en el principio de que la cristalización de la sal disgrega la roca.

DIATOMEAS FÓSILES

Si la roca en que suponemos poder encontrar Diatomeas es de naturaleza calcárea o tiene elementos calizos, la trataremos con ácido clorhídrico, que la disgrega, y luego con abundante agua para eliminar el cloruro cálcico formado; le aplicaremos después el método de los ácidos fuertes o la trataremos con mezcla sulfocrómica.

Si las rocas no son calcáreas se emplea el método del agua hirviendo y el agua fría, o el de las soluciones concentradas. Se opera siempre en una cápsula de porcelana.

El producto, obtenido por uno u otro método, se lava sobre un filtro de mallas finas y se deja reposar; se trata luego con una solución de bicarbonato sódico al 10 por 100, y se traslada a un Erlenmeyer, donde se le añade ácido fosfórico en cantidad capaz de neutralizar el bicarbonato.

El desprendimiento gaseoso y la acción detersiva del fosfato sódico desembarazan las frústulas de partículas minerales. Se filtra la preparación tantas veces como sea necesario y se activa, si es preciso, calentándola.

Si las Diatomeas están contenidas en tierras no arcillosas se emplea el método del jabón.

Se colocan en un tubo de ensayo unos gramos de la tierra que contiene las Diatomeas, a los cuales se añade agua y un poco de jabón, y los hervimos con precaución. De vez en cuando, se observa al microscopio una pequeña muestra del tubo para determinar el momento en que los frústulos estén limpios. Cuando ya lo están se llena el tubo de agua, se lavan y se dejan reposar.

Las tierras arcillosas se tratan con aguas no ácidas, y el sedimento se coloca con amoníaco en una probeta alta, donde se deja 24 horas, agitándolo de vez en cuando.

Se lava abundantemente, se decanta, se recoge el sedimento y se tamiza.

Para efectuar la preparación microscópica se coloca en el centro de un porta, por medio de una pipeta, una gota de agua que contenga Diatomeas en suspensión. Se las deja secar, calentándolas o al aire.

Se pone una gota de xilol, benzol o tolueno encima de las Diatomeas para expulsar el aire de las frústulas. Luego se añade una gota de bálsamo del Canadá. Sin dejar que se seque demasiado, se pone la preparación encima del cubre, previamente calentado. Una vez fría, está en condiciones de ser observada. (Fig. 1.)

FORAMINÍFEROS

Los más conocidos de los Foraminíferos son los Numulítidos, que forman extraordinarios espesores de calizas numulíticas. Son también bastante importantes los sedimentos de Operculinas, Orbitoideos y Fusulinas.

Técnica. Cuando están incluidos en rocas duras, pueden observarse en secciones delgadas y en fondo oscuro o con luz transmitida.

Si las rocas son blandas, margas, arcillas, se disgrega la roca con agua. Se montan los ejemplares en célula seca, y los pequeños, en bálsamo del Canadá, como las Diatomeas. (Fig. 2.)

RADIOLARIOS

Ni son tan abundantes ni han sido tan estudiados como los anteriores. Se encuentran en rocas sedimentarias silíceas. Hasta hace poco no se les reconocía valor en Estratigrafía. Los encontramos fácilmente en rocas terciarias. Se disgregan y montan exactamente igual que las Diatomeas y los Foraminíferos. También se pueden observar *in situ* con luz reflejada. (Figura 3.)

FLAGELADOS

Técnica. Los Silicoflagelados, Dinoflagelados (fig. 4), etc., acompañan a las Diatomeas en las formaciones fosilíferas. Se encuentran en las últimas porciones del tamizado. Se pueden

(Concluye en la lámina D/6)

PALEOZOOLOGIA Y PALEOBOTANICA

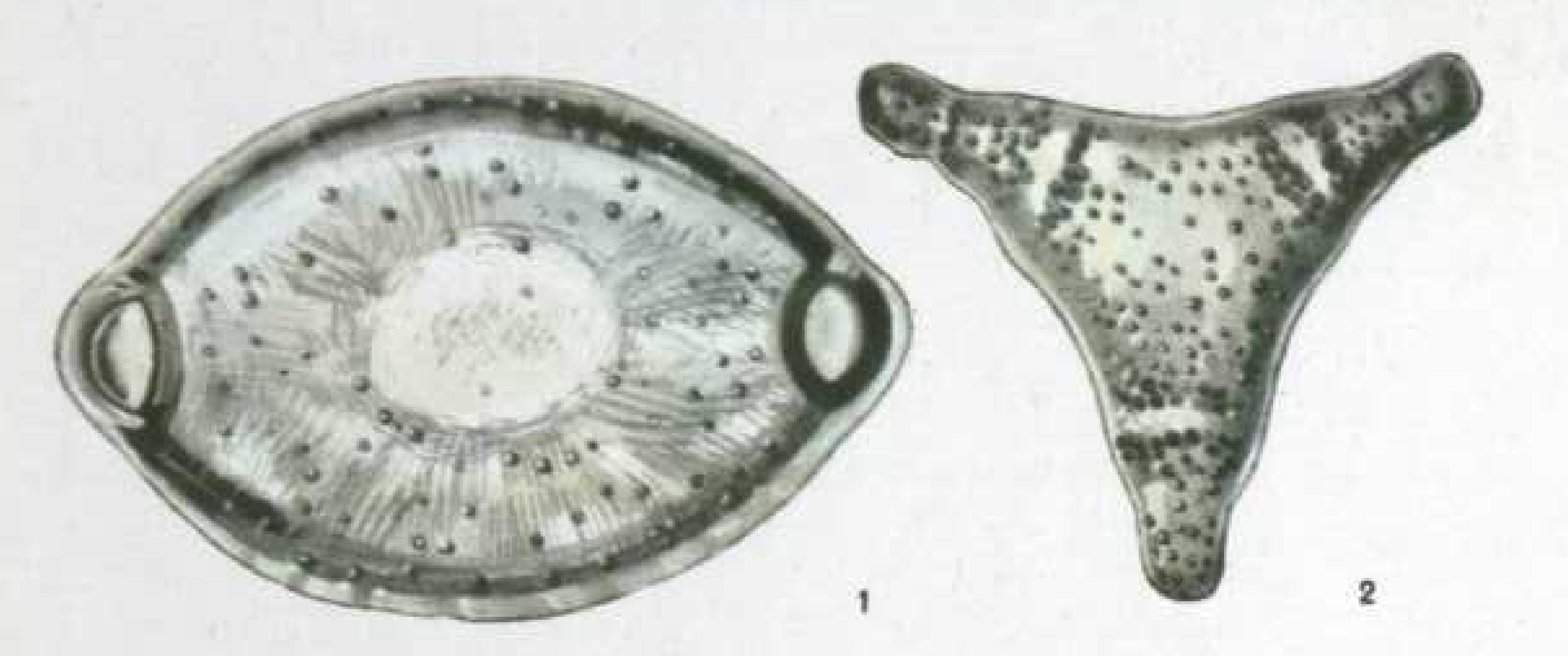


Fig. 1. — Diatomeas fósiles. 1, *Biddulphia primordialis*. 2, *Triceratium glandiferum*.



Fig. 2. — Foraminíferos fósiles. 1, *Dentalina multicostata*, 2, *Cristellaria rotulata*.

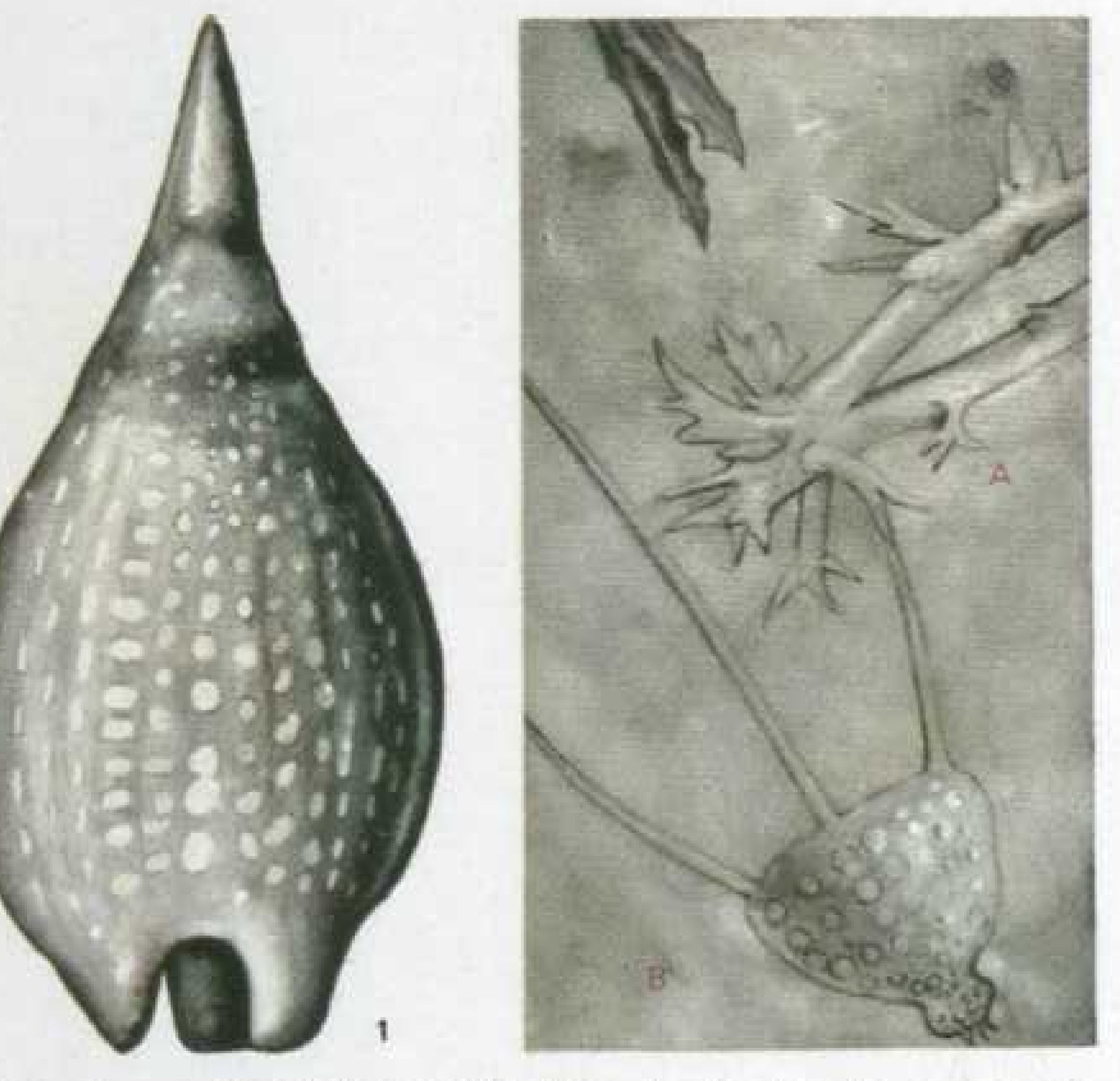


Fig. 3. — Radiolarios fósiles. 1, *Podocyrtis papalis*. 2, *Zigocircus* A y *Lychnocanium* B.

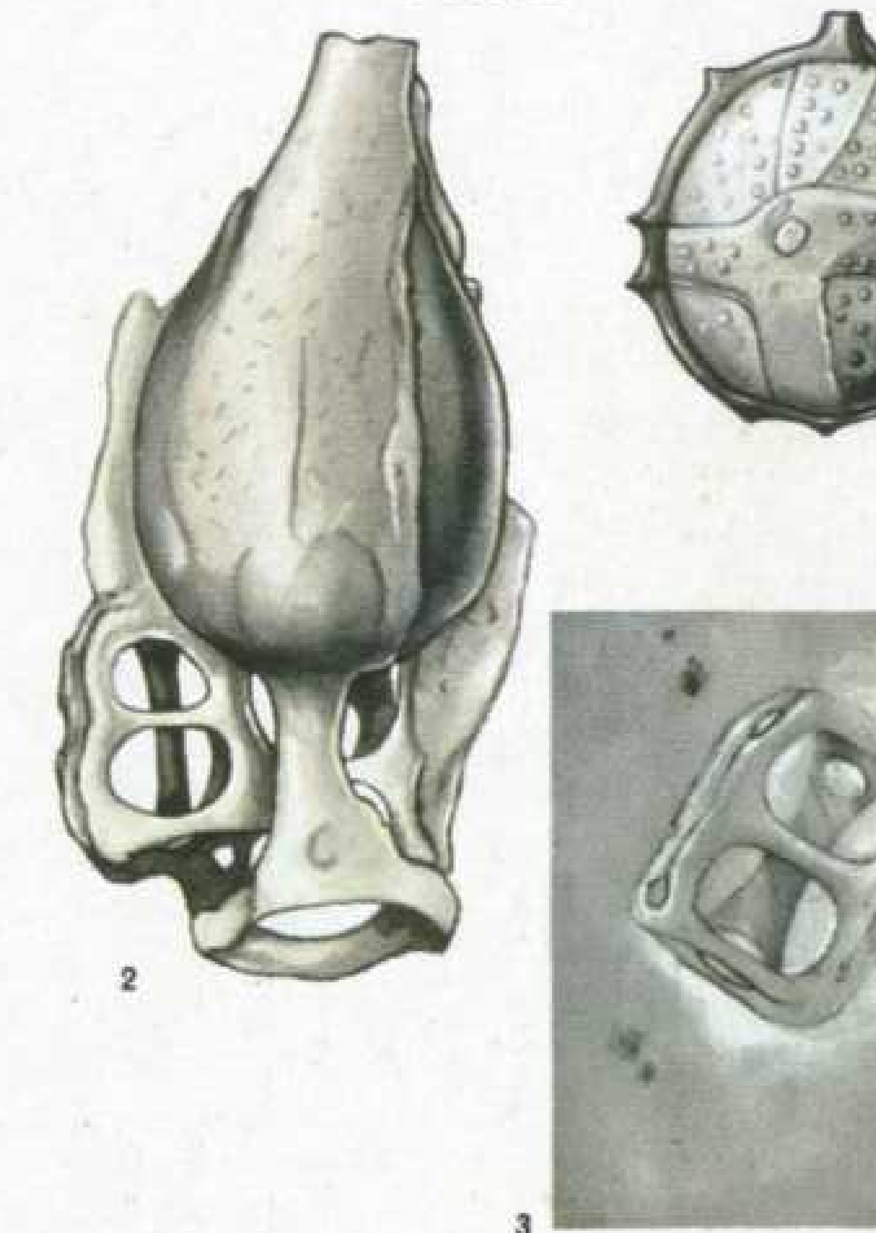


Fig. 4. — Dinoflagelados fósiles. 1, *Peridinites oamaruensis*. 2 y 3, *Ammodochium ampulla*.



Fig. 5. — Otros microfósiles diversos. 1, espículas de esponjas; 2, escolecodontos o piezas bucales de Poliquetos; 3, granos de polen; 4, oogonio de *Chara* 5, valva de un Ostrácodo, y 6, conodonto.

LIQUIDOS ORGÁNICOS

ORINA

Se recoge toda la orina emitida durante 24 horas en vasos cónicos apropiados, que se tapan con un vidrio de reloj. Las partículas en suspensión se depositan en el fondo. Se decanta con cuidado el líquido límpido. Se recoge el depósito formado y se pone en un recipiente cónico de pequeñas dimensiones. Si se quiere conservarlos para sucesivas observaciones se añadirán unos cristales de timol.

Una centrifugación de dos a cinco minutos será suficiente para reconocer los parásitos, los espirilos y los cilindros. Se toma una pequeña porción del sedimento, se pone encima de un porta, se tapa con un cubreobjetos y se observa con objetivo mediano.

Para conservar los elementos orgánicos se pone una parte del sedimento en una cápsula y se somete a la acción del líquido de Wendriner:

Acido bórico	6 gr.
Bórax	6 »
Agua destilada caliente . .	50 ml.

Este líquido disuelve los sedimentos úricos e impide la precipitación de los fosfatos. Este tratamiento respeta la morfología de los elementos organizados, que pueden colorearse con unas gotas de solución acuosa de eosina.

Encima de un porta se pone una gota de sedimento, que se cubre con una gota de solución acuosa de eosina y se tapa con el cubre. El colorante pone de manifiesto el pus, los glóbulos sanguíneos, las células epiteliales, etcétera.

CONSERVACIÓN DE LOS SEDIMENTOS

Los sedimentos urinarios también podrán ser conservados con el líquido fijador de Hayem:

Bicloruro de mercurio .	0,25 gr.
Cloruro de sodio . . .	0,50 »
Sulfato sódico	2,50 »
Agua destilada	100 ml.

Se introduce el sedimento, en pequeñas porciones, en el fijador. Se agita ligeramente y se deja reposar durante 24 horas. Se decanta y se lava con agua destilada varias veces. Se examina en una gota de glicerina. Se colorea con azul de metileno. Se diafragma o se tamiza la luz.

Otro método para reconocer los elementos normales y anormales, las células, los cilindros, microbios, etc., consiste en poner encima de un portaobjetos una gota de sedimento, que se fija al calor, pasando el porta lentamente por la llama. Se tiñe con tionina, al Gram o al Ziehl.

En el sedimento urinario podemos distinguir tres clases de elementos: sedimentos organizados; sedimentos orgánicos; sedimentos minerales.

Los sedimentos organizados (figura 1, A) son las células epiteliales atípicas que proceden del tramo urinario: células de la vejiga, de la vagina, de la pelvis renal, del riñón, etc.

También encontraremos glóbulos rojos, leucocitos, glóbulos de pus, espermatozoides; cilindros urinarios, que son moldes de los tubos secretores del riñón y de los cuales existen gran variedad, y, por último, filamentos urinarios, que son agrupaciones de moco, células, glóbulos de pus, etc., que se disponen en forma vermicular y flotan en la orina con mayor o menor facilidad, según su tamaño.

Los sedimentos orgánicos (fig. 1, B) están constituidos por cristales romboidales de ácido úrico, de oxalato cálcico, urato sódico, urato amónico, leucina, tirosina, colesterina, etc.

Los sedimentos minerales son cristales de base romboidal, de fosfato amónico magnésico; granulaciones amorfas de fosfato tricálcico, pequeñas, o de carbonato cálcico; agujas largas e incoloras de sulfato cálcico; etcétera. (Fig. 1, C.)

CÁLCULOS URINARIOS

Los cálculos del riñón (fig. 2) pueden observarse por transparencia, practicando en ellos un corte longitudinal y puliendo su cara con un papel de vidrio muy fino, hasta lograr el espesor deseado.

El núcleo se puede diferenciar fácilmente por estar rodeado por círculos concéntricos claramente visibles. La superficie pulida se lava en seguida con agua, se seca y se monta en bálsamo, con la parte pulida contra el vidrio. Se presiona ligeramente para expulsar el aire. Una vez seco el bálsamo, se pule la otra cara con papel de vidrio fino.

Cuando la luz puede atravesar el cálculo, se seca y se tapa con un cubreobjetos.

EXAMEN DEL PUS

Se observa en fresco entre porta y cubre; si es necesario, se diluye en una solución fisiológica. Hay amebas, micosis y actinomicetos que pueden también observarse así.

También podemos hacer extensión del pus, fijarlo con calor suave y colorearlo por el método panóptico.



LIQUIDOS ORGANICOS



ORINA

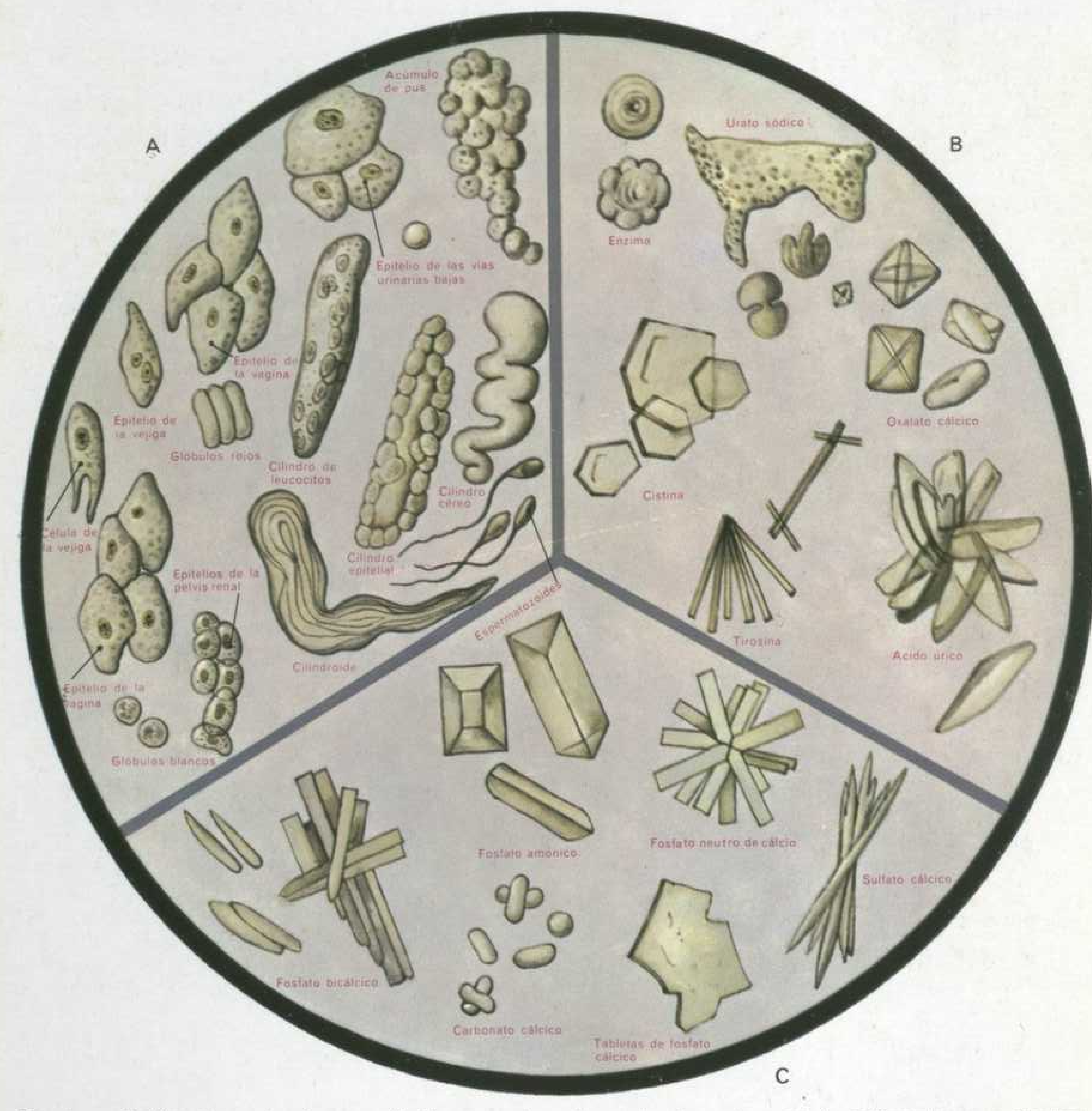


Fig. 1. — Sedimentos urinarios constituidos por tres clases de elementos: en A, sedimentos organizados; en B, sedimentos orgánicos, y en C, sedimentos minerales.



Fig. 2. — Diversos cálculos renales. 1, de ácido úrico y uratos; 2 y 3, de oxalato cálcico; 4 y 5, de fosfatos.

COPROLOGÍA

Las materias, recogidas en un vaso seco, pueden prepararse en varias porciones para facilitar su estudio. Puede atenuarse su olor desagradable con unas gotas de nitrobenzeno. Se diluye una gota de materia fecal en unas gotas de solución fisiológica, encima de un portaobjetos, que se tapa con un cubre. La película entre porta y cubre debe ser escasa, para que permita el paso de la luz a través de ella.

Las materias en examen pueden tratarse con el líquido de Lugol doble:

Yodo	1 gr.
Yoduro potásico . . .	2 »
Agua	100 ml.

El líquido se mezcla suavemente con las materias para evitar las aglutinaciones. En el microscopio polarizante, ciertos elementos (cristales, huevos de parásitos) aparecen muy claros entre los nicoles cruzados.

Enriquecimiento. Método de Teleman-Rivas

El examen después de enriquecimiento se emplea para hacer visibles los huevos de Helmintos y los quistes de Protozoarios.

En una copa cónica se pone un centímetro cúbico de materia, tomada de diversos puntos de la masa que se va a examinar y se añaden cinco miligramos de la mezcla siguiente:

Agua	100 ml.
Acido acético	5 gr.

Con una espátula de madera se remueven la materia y el líquido hasta que se obtiene un líquido homogéneo, que se filtra a través de un tamiz de cobre de mallas de un milímetro y se decanta. Se ponen cinco milímetros en un tubo de centrífuga, a los que se añaden cinco milímetros de éter sulfúrico. Se agita todo para obtener una mezcla homogénea y se centrifuga durante medio minuto con la centrífuga de mano. Se decanta rápidamente el líquido que queda encima. Por medio de una pipeta se recoge el sedimento y se pone encima de un portaobjetos. El examen microscópico debe hacerse diafragmando, con luz escasa, y empleando primero el objetivo en seco y posteriormente, si es necesario, el objetivo de inmersión, y veremos todos los elementos de la figura 1. Entre los parásitos encontraremos Cestodos y Trematodos y sus huevos. Los huevos de Cestodos se aclararán con lejía de sosa al cuarto durante media hora. Los Rizópodos, Esporozoarios, Flagelados e Infusorios intestinales se observan, generalmente, en las mucosidades y partes estriadas de la sangre. Puede hacerse con ellas un frotis, fijarlas con líquido de Bouin y teñirlas con hematoxilina férrica.

Los Hongos se estudiarán directamente. Ciertas preparaciones pueden teñirse con azul láctico o con solución Lugol.

Las bacterias se observan coloreándolas por el método de Gram, el cual permite diferenciarlas en gramnegativas, colibacilos, bacilos disentéricos, etcétera. Los grampositivos, *Staphilococcus, Strepyococcus, Proteus*, etc., aumentan en caso de enteritis.

Coloración de los Protozoos intestinales

Se introduce un fragmento de materia fecal en una solución de cloruro sódico al 6 por 100, formando con ella una suspensión de consistencia tal que permita poner una gota en un porta. Se añaden unas gotas de la solución siguiente:

Agua destilada	10 ml.
Yodo coloidal (4 % de yodo).	6 gr.
Solución acuosa de rojo de anilina (eosina amarilla) 10 %	1 gr.

Se mezclan y se observa al microscopio. Los parásitos aparecerán teñidos de color intenso, sobre todo los quistes, muy refringentes.

Las bacterias y partículas fecales se tiñen en rosa. Los granos de almidón, en color violeta casi negro.

Descripción de los huevos de parásitos más corrientes

Ascaris lumbricoides. Ovoides, de 40 × 60 micras. Están provistos de una gruesa cubierta mamelonada y son fácilmente reconocibles, salvo cuando esta cubierta desaparece. (Fig. 2.)

Oxyurus vermicularis. Se encuentran con más frecuencia que en las heces en las uñas de los niños parasitados. Son ovoides, pero asimétricos, con una cara plana, y están provistos de una cubierta lisa; en su interior se encuentra un embrión giriniforme; miden de 30 a 32 por 50 a 60 micras.

Trichuris trichiura. Son muy frecuentes en las heces fecales, y aun típicos de ellas. Son de color pardo amarillento; tienen forma de limón, cubierta espesa y polos con botones muy refringentes. Su interior es granuloso. Miden 50 × 25 micras. (Figura 2.)

Ancylostoma duodenale. Son elípticos, con una cubierta muy fina, lisa y transparente. Tienen en su interior dos, cuatro u ocho células. Son sus dimensiones 60 × 40 micras. (Fig. 2.)



COPROLOGIA



Fig. 1. — Coprología. Algunos de los elementos y residuos más frecuentes que suelen hallarse en las heces fecales humanas.

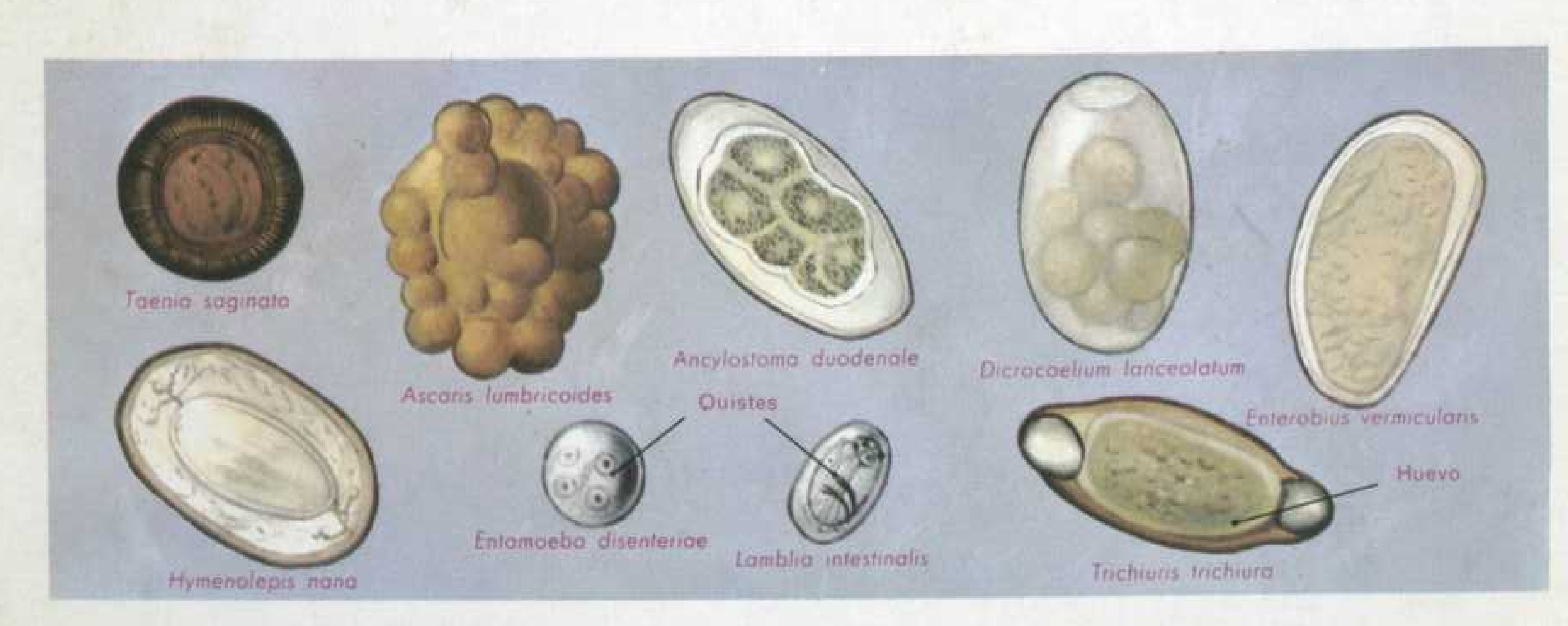


Fig. 2. — Huevos y quistes de algunos parásitos intestinales en el hombre.

OBSERVACIONES INDUSTRIALES

TEJIDOS

Los tejidos están constituidos por fibras vegetales, animales o sintéticas. Su estudio es muy interesante, a la par que útil. Su estudio microscópico nos permitirá poner de manifiesto su composición y el número de mallas por centímetro (figs. 3-5), así como las posibles adulteraciones que presenten.

Las fibras pueden estudiarse a lo largo, o sea en longitud, o a través, cortadas. En algunos casos será conveniente decolorarlas para lograr una mejor observación.

Examen longitudinal. Las fibras, aisladas del tejido que forman, se tratan con una solución de carbonato de sodio al 3 por 100. Se lavan y se dejan secar. Se disocian con agujas apropiadas. Se examinan en glicerina con luz natural y objetivos débiles.

Decoloración de tejidos. La muestra de tejido que se ha de desteñir se sumerge durante media hora en lejía jabonosa al 10 por 100 para eliminar el apresto. La muestra, todavía húmeda, se ata a un corcho (fig. 1) y se introduce en una campana que contiene un recipiente con cloruro cálcico, al que se añade, con una pipeta, ácido clorhídrico. El gas cloro que se libera decolorará la muestra.

Cuando ya esté suficientemente decolorada, se saca la muestra y se aislan unas cuantas fibras de la trama, que se disocian con agujas.

Se examinan en una gota de glicerina, evitando emplear luz artificial.

Las fibras se tratan con la mezcla siguiente, preparada en el momento en que se va a emplear:

Yoduro potásico	1 gr.
Agua	100 ml.
Yodo	a saturación

Puestas las fibras encima de un porta, se les añade una gota de reactivo. El reactivo sobrante se extrae mediante un pedazo de papel filtro. Sobre el porta se pone un cubreobjetos. En el borde del cubre se echa una gota de la solución siguiente:

Glicerina	2
Agua destilada	4
Ácido sulfúrico	6

Las fibras de algodón y el lino se colorean en azul. El cáñamo se tiñe en azul verdoso en el interior y amarillo en el exterior. La seda natural se tiñe en color pardo. (Fig. 2.)

La lana y la seda se disuelven en una solución de sosa cáustica al 10 por 100.

Cortes transversales. Con los hilos de la trama, unidos por un hilo, se forman paquetes, de unos dos centímetros de longitud, que se introducen en una solución de goma arábiga. Una vez impregnados e incluidos en medula de saúco se cortan con micrótomo de mano. También pueden incluirse en parafina y cortarse siguiendo los métodos generales. Los de lana se pueden incluir en parafina o celoidina y cortarse con una hoja de afeitar, dando a los cortes una inclinación de 15°.

Preparación. Se deshidratan las fibras en soluciones alcohólicas de concentración creciente; 25°, 50°, 70° y absoluto. Se dejan dos horas en los tres primeros alcoholes y cuatro en el absoluto. Luego se aclaran los hilos en esencia de girasol y xilol, aceite de cedro, mezcla de esencia de bergamota, aceite de cedro y ácido fénico. Se montan en gelatina glicerinada.

Por su transparencia, puede ser más fácil su observación si, por medio de filtros adecuados, se reducen la abertura del iris del condensador o la intensidad de luz.

Para la preparación de cortes transversales se enrollan las fibras sobre un marco de alambre y se sumergen durante media hora en una solución de celoidina en éter y alcohol a partes iguales. Se dejan secar al aire o coagular con cloroformo.

También cabe impregnar las fibras con una solución de goma arábiga:

Goma arábiga	47,5 partes
Agua	47,5 »

Despué de disuelta la goma arábiga en el agua se añaden cinco partes de glicerina.

Se seca la preparación en la estufa. Las fibras así impregnadas se incluyen en corcho o medula de saúco y se cortan con la mano o con micrótomo de mano.

Los tejidos pueden observarse con microscopios de comparación, que son, fundamentalmente, dos microscopios unidos en un solo ocular (fig. 6) en uno de cuyos objetivos se enfoca la muestra testigo y en el otro, el problema. Rinden buenos servicios para descubrir los fraudes.

La lupa cuentahilos, como su nombre indica, es muy útil para averiguar el número de hilos que componen la trama de un tejido, tomando como unidad el centímetro o el milímetro cuadrado, según sea la técnica empleada. (Lám. A/1, fig. 1.)

TEJIDOS

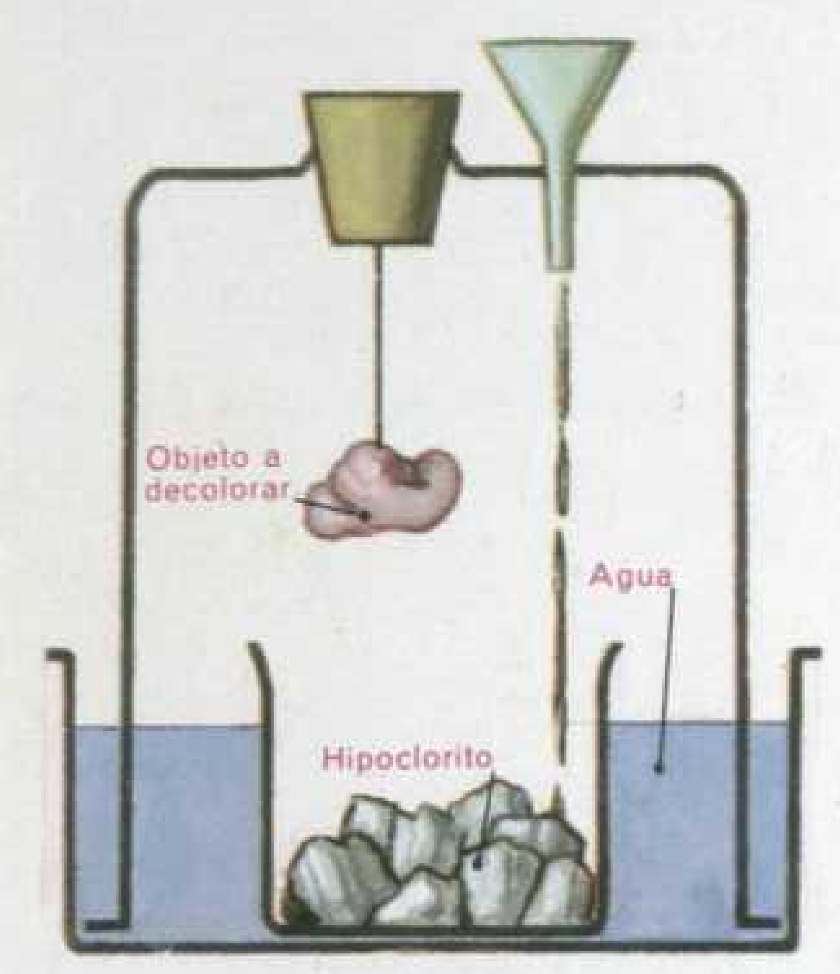


Fig. 1. — Dispositivo para la decoloración de tejidos y fibras textiles.

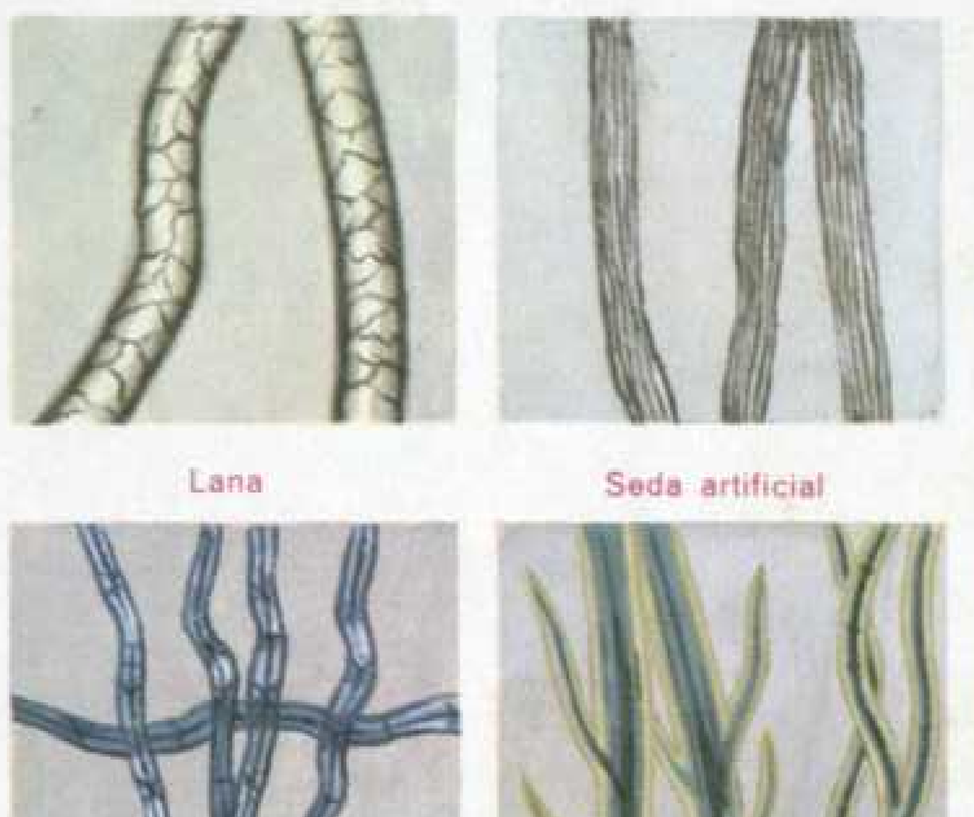


Fig. 2. — Aspecto de algunas fibras textiles.



Fig. 3. — Tejido de cinta barnizada.

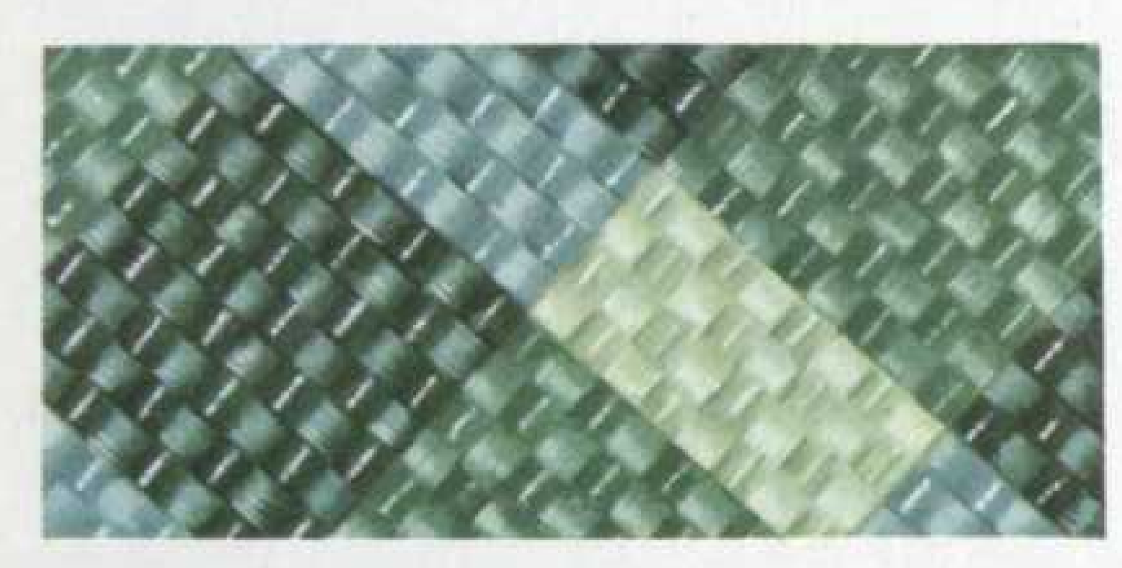


Fig. 4. — Tejido de rayón al acetato.



Fig. 5. — Tejido de lino.

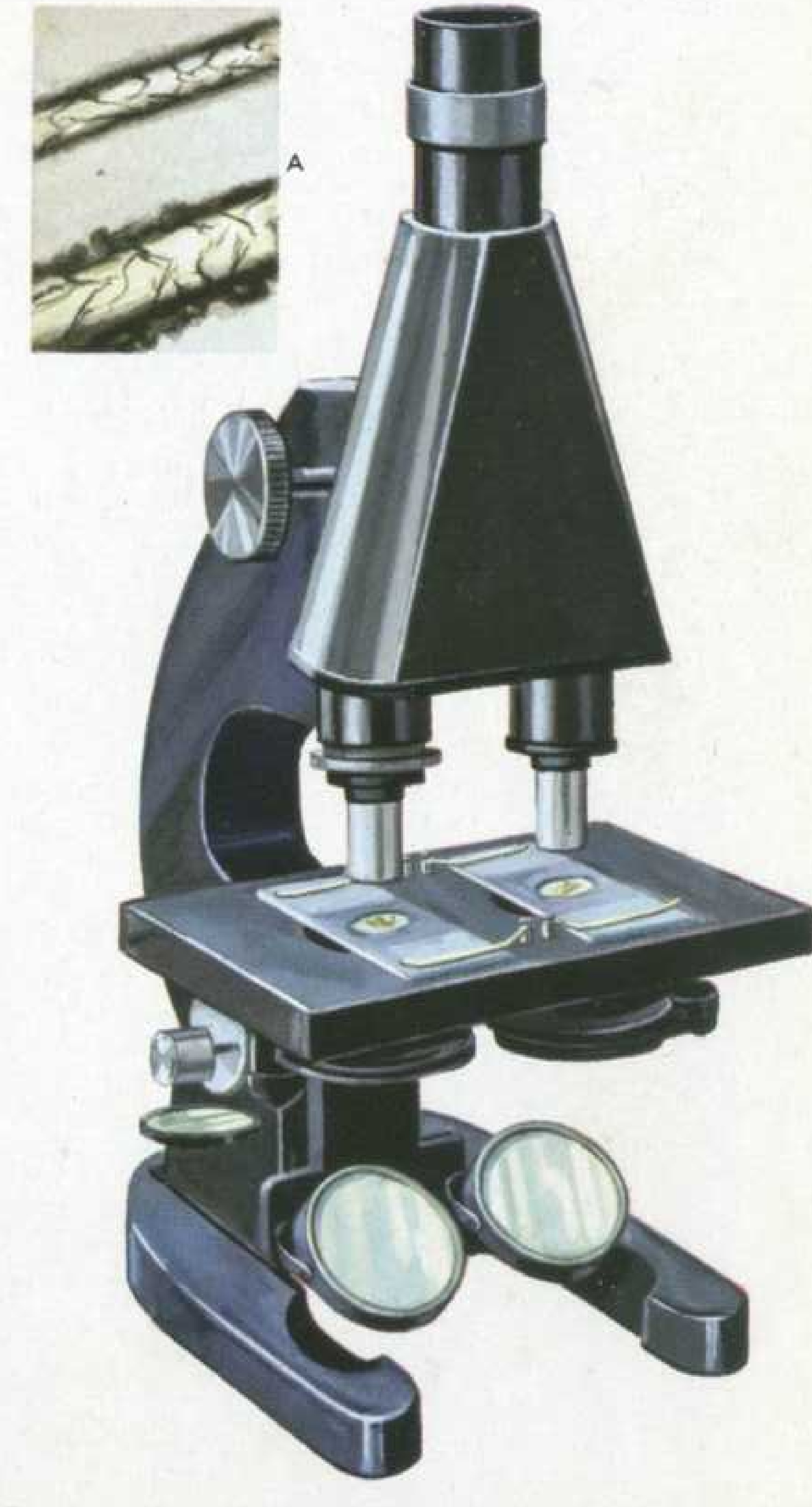


Fig. 6. — Microscopio comparador. En A, comparación de dos hebras de lana.

PAPELES

Preparación. Es preciso aislar las fibras de los demás elementos que puedan acompañarlas en la composición del papel; encolado, materias colorantes y de carga. (Fig. 2.)

Para ello se hierve una muestra de papel en agua destilada hasta obtener una pasta amorfa. Esta pasta, una vez retirada del fuego y enfriada, se disgrega con agujas. El examen microscópico permitirá descubrir fibras extrañas a la composición del papel. Así, las de lana son inconfundibles por sus escamas imbricadas. (Fig. 4, A.)

La muestra se introducirá en seguida en una solución de sosa cáustica al 1 ó 2 por 100, hervida. Se filtrará a través de una tela metálica fina. Para eliminar la sosa se lava el residuo repetidamente con agua destilada. Una vez exprimido para eliminar el agua, se deposita este residuo encima de un porta. Se le añaden unas gotas de alcohol, se deja secar, y se le agrega una gotita de solución yodoyodurada:

Yodo	1,15 gr.
Yoduro potásico	2 »
Glicerina	2 »
Agua destilada	20 ml.

El reactivo sobrante se absorbe mediante un pedazo de papel de filtro. Se tapa la preparación con el cubre. El contacto con la solución antedicha tiñe las fibras de algodón, lino o cáñamo en marrón más o menos oscuro; las de trigo, maíz o centeno, en gris.

Reactivo de Herzberg. El licor de Herzberg, o cloruro de cinc yodado resulta de mezclar dos soluciones:

a)

Cloruro de cinc . . .	10 gr.
Agua destilada	5 »

La disolución calienta el líquido. Una vez frío, se le añade:

b)

Yodo	0,20 gr.
Yoduro potásico . .	2 »
Agua destilada . . .	10 »

Se deja reposar. Se decanta a los varios días y se conserva bien tapado.

Por la acción de este reactivo, la celulosa, el algodón, el lino y el cáñamo se tiñen de color rojo violáceo; la pasta química, el trigo, el maíz y el arroz, en azul violáceo; la lana, el yute y la paja molida, en amarillo. (Figura 4.) Si los colores son demasiado pálidos, se añade una pequeña cantidad de yodo o de cloruro de cinc. En caso contrario añádese agua.

CELULOSA DE MADERA

La madera de Coníferas y de árboles de hojas caducas, disgregada químicamente mediante diversos procedimientos (sodio y sulfato por un lado, sulfito por otro), da una pasta, conocida con el nombre de celulosa, constituida por las traqueidas bien conservadas de aquellos vegetales. (Figura 3, A.) En la celulosa de pino la pared celular muestra las soluciones de continuidad en forma de ventana.

PASTAS DE MADERA Y PASTAS QUÍMICAS

Las partículas que provienen de la trituración de maderas de Coníferas y de otros árboles constituyen, después de varias manipulaciones y extracciones, las pastas de madera. Ha de distinguirse entre pastas de madera químicas y mecánicas. En las pastas de madera de Coníferas (fig. 3, B y C), las fibras presentan aureolas redondas, muy patentes en las pastas mecánicas y más atenuadas en las químicas.

Pastas mecánicas

Se hace actuar:

Sulfato de anilina	1 gr.
Agua	10 »
Ácido sulfúrico	2 gotas

El sulfato de anilina tiñe en amarillo los elementos lignificados. Si una muestra queda uniformemente teñida, consta de fibras mecánicas. De lo contrario, las fibras están mezcladas.

PASTAS DE ALGODÓN

El papel de filtro está constituido mayormente por fibras de algodón (figura 1, C y D), utilizadas para los tejidos, a las que se añaden fibras de lino. Con luz reflejada, se descubre la existencia de algodón por el crepado de sus fibras. La fuerte porosidad del papel de filtro se debe a los canales aeríferos (2/3 del volumen total).

CAUCHO

Caucho manufacturado

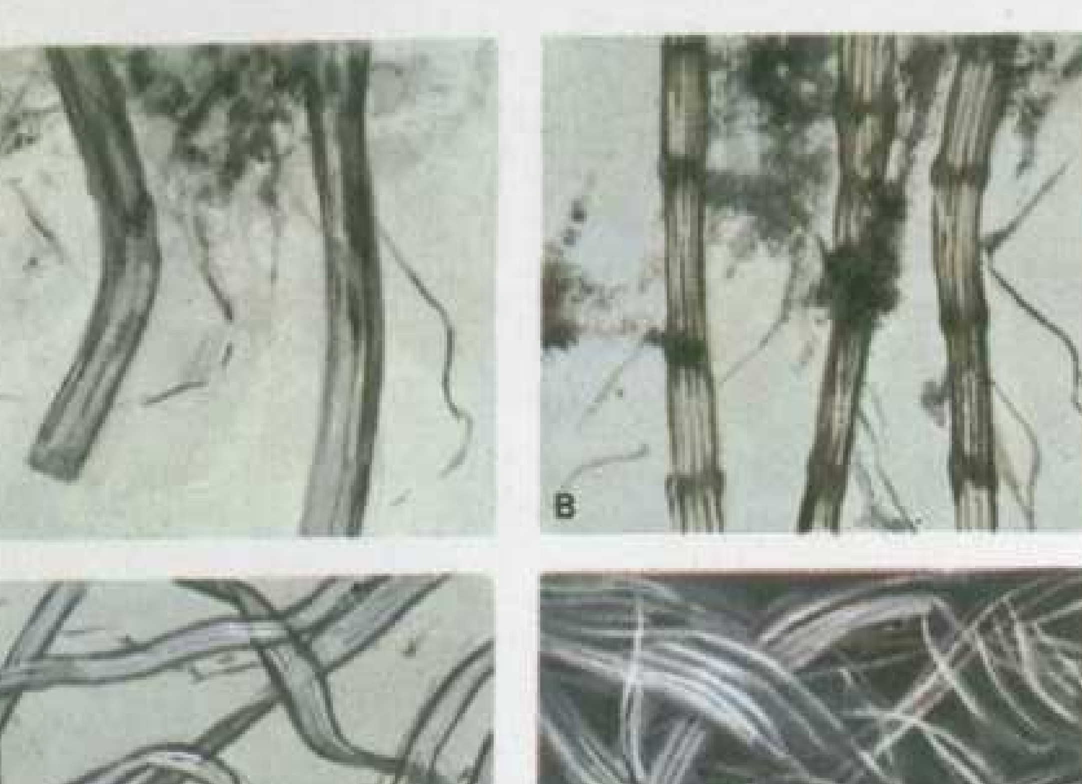
El examen puede hacerse por transparencia.

Se disuelve la muestra en líquidos apropiados.

La solución, convenientemente extendida, presenta diferentes caracteres según esté más o menos concentrada la preparación.

El examen sin preparación se hace tomando pequeñas partículas de caucho y montándolas en resina. Se pueden hacer los cortes con un micrótomo Lelong o con uno de congelación, con hoja seca o humedecida con una ligera capa de glicerina. Se montan en resina y se conservan con objetivo de mediano aumento. (Fig. 5.)

PAPELES



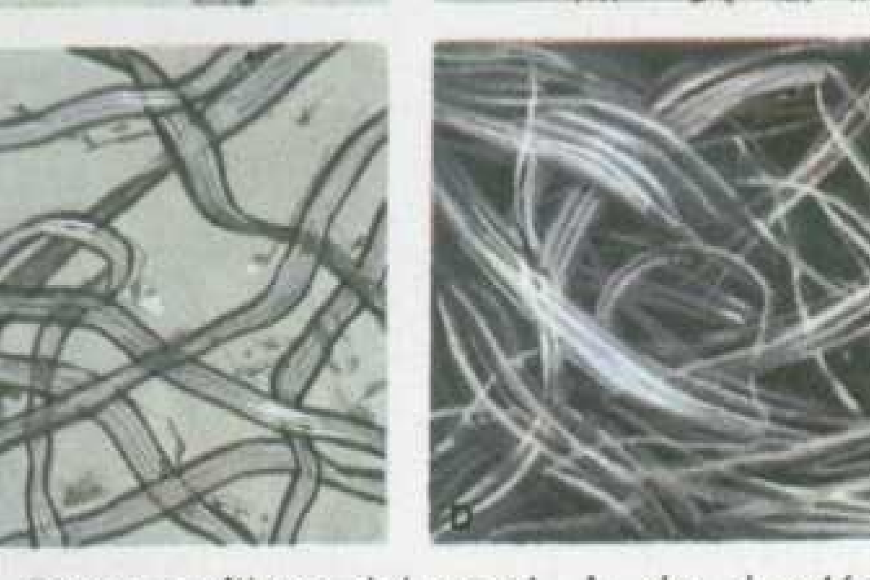


Fig. 1. — Diversas fibras del papel. A, de algodón; B, de lino; C, de algodón en el papel de filtro; D, algodón preparado para filtros.

Fig. 2. — Fragmento de periódico que revela su estructura vegetal.

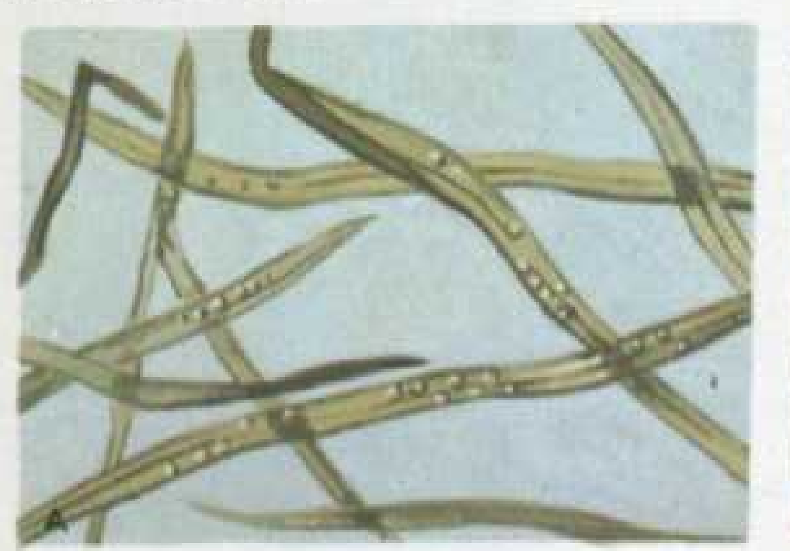






Fig. 3. — Pastas de madera. A, de celulosa; B, de madera de Conífera (× 200), y C, ídem (× 125).

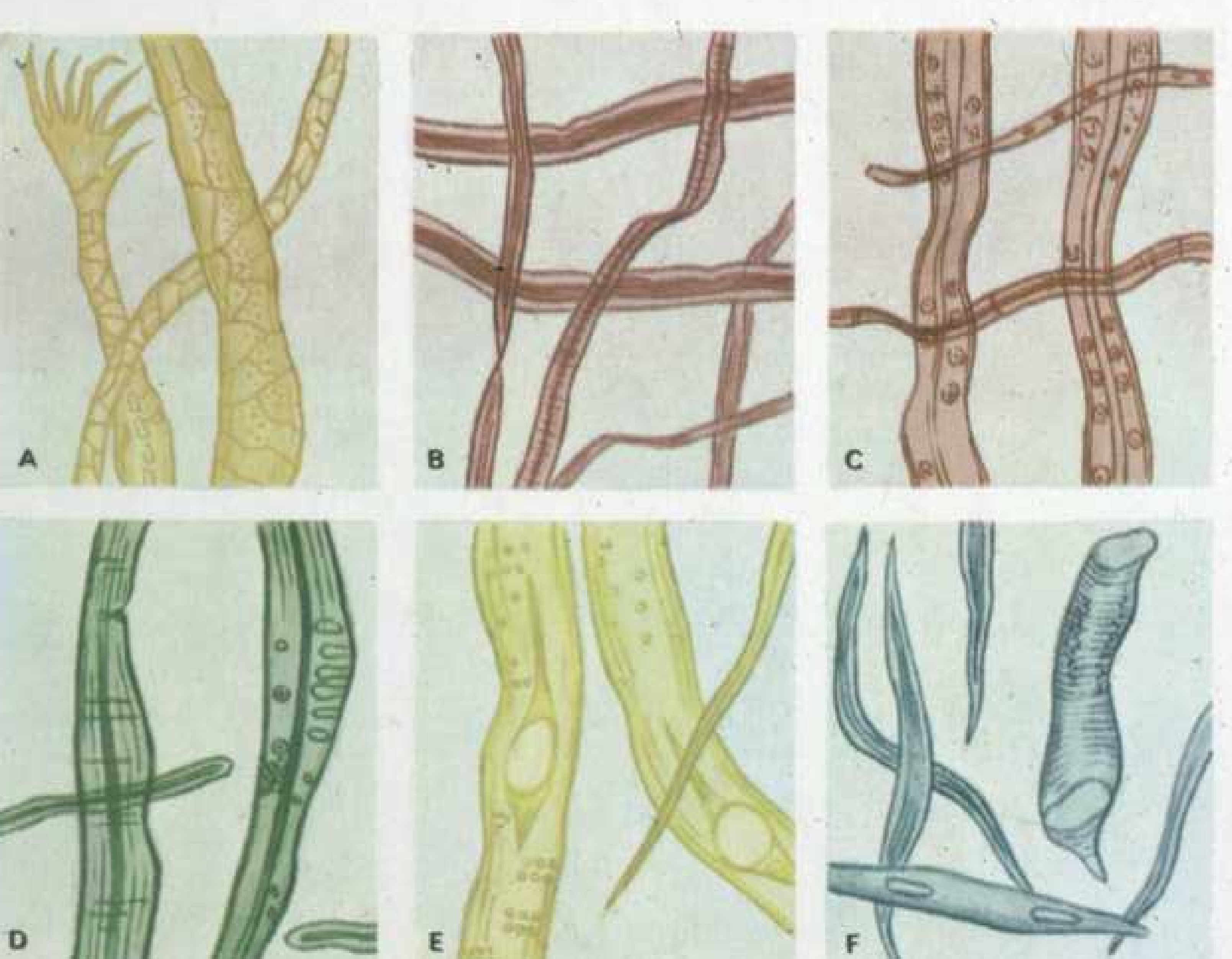


Fig. 4. — Análisis de papeles. A, lana; B, algodón; F, hilo, teñidos por el reactivo de Herzberg. C, abeto; D, pino; E, castaño, teñidos por el de Sotton.



Fig. 5. — Esponja de caucho vista a la lupa.

MICROQUÍMICA

Está basada en el empleo de una pequeñísima cantidad de materia. Podemos operar con cantidades que oscilan entre centésimas y milésimas de miligramo.

Se pueden emplear microscopios muy sencillos, pues no son precisos grandes aumentos. Pero sí deben ser resistentes a los reactivos utilizados durante la observación.

Portaobjetos y cubreobjetos. Deben estar bien construidos y preparados para resistir calentamientos fuertes. Eventualmente servirán para las reacciones, como si se tratase de tubos de ensayo, y también se utilizarán como cápsulas de evaporación.

Resistirán temperaturas de 300° C. Necesitaremos también unos cuantos portaobjetos partidos en dos para realizar mezclas o hacer presión sobre las sustancias puestas en el porta. Los cubreobjetos podrán ser normales o estar preparados en forma de célula de Legendre (fig. 1); esto último se consigue calentando los ángulos del cubre a la llama, con lo cual se doblarán lo suficiente para obtener, una vez puestos encima del porta, una cámara de un milímetro de altura, que en algunos casos de cristalización lenta evitarán que la preparación se deseque.

Preparación de los portaobjetos. Como algunas reacciones con ácidos y álcalis podrían atacar el cristal, se recubren algunos portas con bálsamo del Canadá, que es muy resistente a los ácidos, al amoníaco, etc., y es fácilmente lavable. El procedimiento más simple consiste en cubrir el porta con una espesa capa de bálsamo y calentarlo suavemente hasta que gotee el bálsamo sobrante. Se seca en la estufa hasta que adquiera una dureza tal que no se raye con la uña.

Calentamiento. Para calentar las preparaciones, la llama de los mecheros debe reducirse al mínimo.

Para calentar y concentrar unas gotitas de reactivo es excesiva una llama de un centímetro de alto. Se debe, pues, usar un pico de mechero Bunsen.

Volumen de las sustancias a utilizar. Para operar con precisión se debe experimentar sobre gotitas de un miligramo, que ocuparán una superficie de dos milímetros aproximadamente de diámetro. Para manipular con tan pequeñas cantidades se utilizan tubos capilares de pequeño calibre, que tienen sobre las pipetas la ventaja de poder reemplazarlos y la de no tener que limpiarlos cada vez.

Utensilios. Los instrumentos necesarios son: pinzas de extremos de platino, espátula y aguja de platino, un pequeño mortero de ágata, papel fuerte para cubrir los granos que se han de moler y unas hojas de papel de filtro. Los reactivos se manejan con hilos de platino de 0,5 milímetros de diámetro montados en el extremo de varillas de vidrio o de hilos de vidrio de la misma sección.

Filtraciones. Puede operarse sobre un portaobjetos inclinado. El líquido se filtrará a través de una banda de papel de filtro de 1 por 10 milímetros, doblado en forma de V, mojado y aplicado sobre la lámina. Para filtrarlo, la gota se deposita entre las ramas de la V. Entre el filtro y el vidrio se retendrán cinco miligramos de líquido; por lo tanto, se debe operar con gotas de menos de 0,01 miligramos y diluirlas. (Fig. 2.)

Cristalizaciones. La cristalización de numerosas sustancias se obtiene extendiendo encima del portaobjetos, bien limpio, una solución saturada y dejándola evaporar al aire, al abrigo del polvo. Para fijar los cristales se añaden unas gotitas de solución diluida de goma arábiga o en agua albuminosa.

Cristales diversos. Numerosas sustancias que en estado cristalino presentan formas y colores brillantes, observadas con luz polarizada adquieren facetas diferentes y más brillantes aún. Así ocurre, por ejemplo, con la asparragina, el acetato de cinc, los ácidos bórico, gálico, cítrico, tartárico y úrico; el alumbre, la alizarina, el arseniato sódico, el bicloruro de mercurio, el clorato potásico, el cromato potásico, los sulfatos de cobre, de hierro, potásico, de cinc, etc. (Figs. 3-6.)

Ciertos cristales pueden observarse en su misma agua a saturación. La sustancia que ha de examinarse se coloca en una probeta y se le añade agua, que se calienta hasta la concentración necesaria para que, al enfriarse, se formen cristales. Se calientan el porta y el cubre durante unos minutos.

En el centro de la célula se vierten unas gotas del líquido hirviendo contenido en la probeta. Se tapa con el cubre, haciendo ligera presión. Se absorbe el líquido sobrante con un papel de filtro Se sella con barniz. La célula debe contener el líquido límpido, que, al enfriarse, formará los cristales. Se observa con luz polarizada. Al cabo de cierto tiempo los cristales pierden su limpieza. Se los reaviva calentándolos para disolverlos y obtener con ellos nuevas combinaciones.

MICROQUIMICA

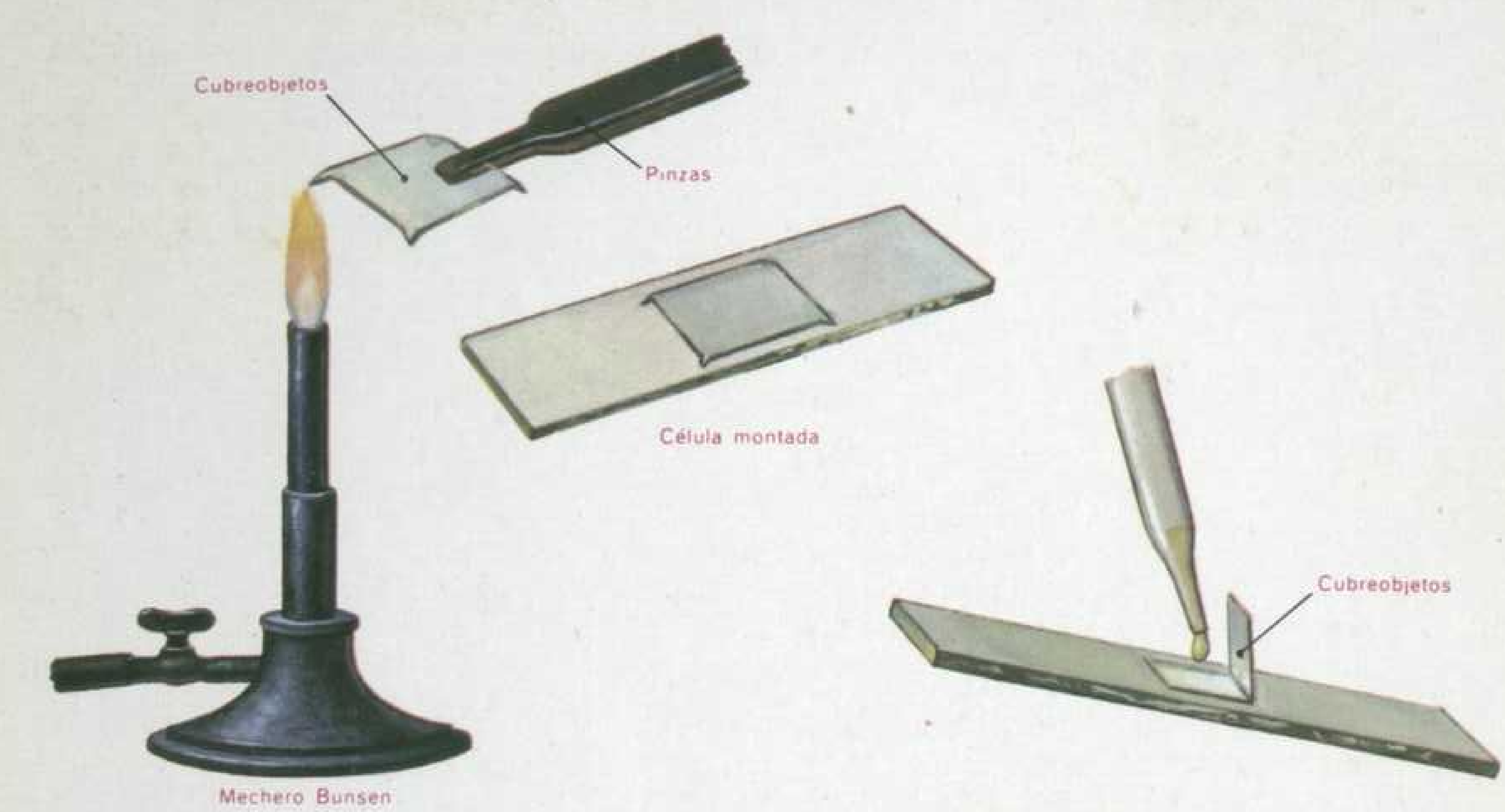


Fig. 1. — Preparación de la célula de Legendre.

Fig. 2. — Filtración microquímica.

Fig. 3. — Cristales de tetrafluoruro de xenón.





Fig. 4. — Cristales de clorato potásico vistos con luz polarizada.



Fig. 5. — Cristales de ditartrato potásico vistos con luz polarizada.



Fig. 6. — Reacción microquímica, con luz polarizada, que nos descubre pequeñas cantidades de plata.

METALOGRAFÍA

El examen microscópico de los metales permite estudiar su constitución química, la combinación y la disposición de sus elementos, sus defectos, su comportamiento, etc.

La opacidad de los metales no permite observarlos en secciones delgadas ni con luz transmitida, como las rocas y los minerales. En Metalografía deben observarse las muestras con luz reflejada. La talla de estos objetos, su forma y espesor pueden ser variables. Hay gran número de aparatos de observación, aunque se haya adoptado comúnmente el microscopio metalográfico. Cualquiera que sea la forma del microscopio empleado, la muestra metálica que se haya de observar debe tener una superficie pulida como un espejo, sin rayaduras.

El pulido de los metales tiene una influencia considerable en el resultado del análisis. Su preparación es larga y delicada, y debe efectuarse con mucho cuidado. (Fig. 1.)

Microscopio metalográfico

Se emplean aparatos metalográficos especiales (fig. 2) o aparatos normales en los que se ha mejorado el sistema de iluminación.

Preparación

De la masa a estudiar se toma una porción de unos dos centímetros cúbicos, poco más o menos, lo suficientemente grande para que el operador pueda tenerla entre los dedos.

Los bordes de esta muestra se cortarán en sentido oblicuo para que, al pulirlas con papel de vidrio, las caras que se van a observar no se estropeen rápidamente.

Pulimento.

Se emplea una muela de gres o de carborundo. La cara que ha de examinarse se dirige hacia la muela y se procede a desgastarla. Se evita el calentamiento, que podría ser perjudicial para la muestra por producir contracciones o movimientos moleculares, mediante la vaporización con agua. Para los metales dulces (cobre, latón) se emplea, en lugar de agua, aceite. Durante cada fase del pulimento debemos tomar las precauciones necesarias para evitar el calentamiento.

Para terminar la operación del pulimento se tratará la pieza con esmeril número 0000. El pulimento definitivo se hace encima de un disco de trapo empapado con una papilla de aluminio calcinado y jabón, y movido por un motor eléctrico. El grado de finura del aluminio depende de la dureza del metal en observación. Es útil tener varios discos de trapo empapados con diferentes aluminios más o menos finos. Estos trapos pueden lavarse con agua destilada después de cada pulimento y ponerse a secar, al abrigo del polvo, pues cualquier partícula silícea que recogieran sería suficiente para producir rayas en las superficies que se han de pulir.

Una vez pulida, la pieza se limpia con un chorro de aire. Nunca se deben emplear lienzos.

ATAQUE QUÍMICO O GRABADURA

Esta operación permite poner de manifiesto la estructura de una muestra y conocer los efectos de determinados reactivos.

La superficie pulida de la muestra se sumerge enteramente en reactivo durante unos segundos. Se arrastra luego el reactivo mediante un chorro de agua tibia. No debe frotarse ni tocar con los dedos o con un objeto cualquiera. La muestra se secará con aire comprimido.

Cuando se trata la superficie pulida con reactivos de ataque (ácidos concentrados, cianuro potásico, permanganato potásico) el pulido desaparece y son visibles las rayaduras que no lo eran. La causa de este fenómeno es que la película producida por el pulido, de unas milésimas de milímetro, rellena las rayaduras, pero al desaparecer por el reactivo, queda la estructura subyacente. Si el ataque es prolongado, la mayoría de las rayaduras desaparecen.

Hay varios reactivos apropiados: ácidos débiles, sobre todo los ácidos clorhídrico y nítrico en solución acuosa o alcohólica (1 mililitro de ácido clorhídrico de densidad 1,22 por 199 mililitros de agua destilada; 1 mililitro de ácido clorhídrico de densidad 1,19 en 100 mililitros de alcohol etílico); soluciones de sosa, potasa o amoníaco a las cuales se añade, en caliente, en el momento en que van a emplearse, unas gotas de agua oxigenada. La sosa y el amoníaco colorean los constituyentes heterogéneos del cobre; la potasa se emplea en aleaciones de aluminio. La tintura de yodo pone de manifiesto los diferentes aspectos de aceros que contienen fósforo.

Otro método consiste en dejar que las superficies muy pulidas y brillantes se oxiden y tomen los colores típicos de los óxidos metálicos. Cohen ha empleado este método en la observación de los meteoritos.

METALOGRAFIA

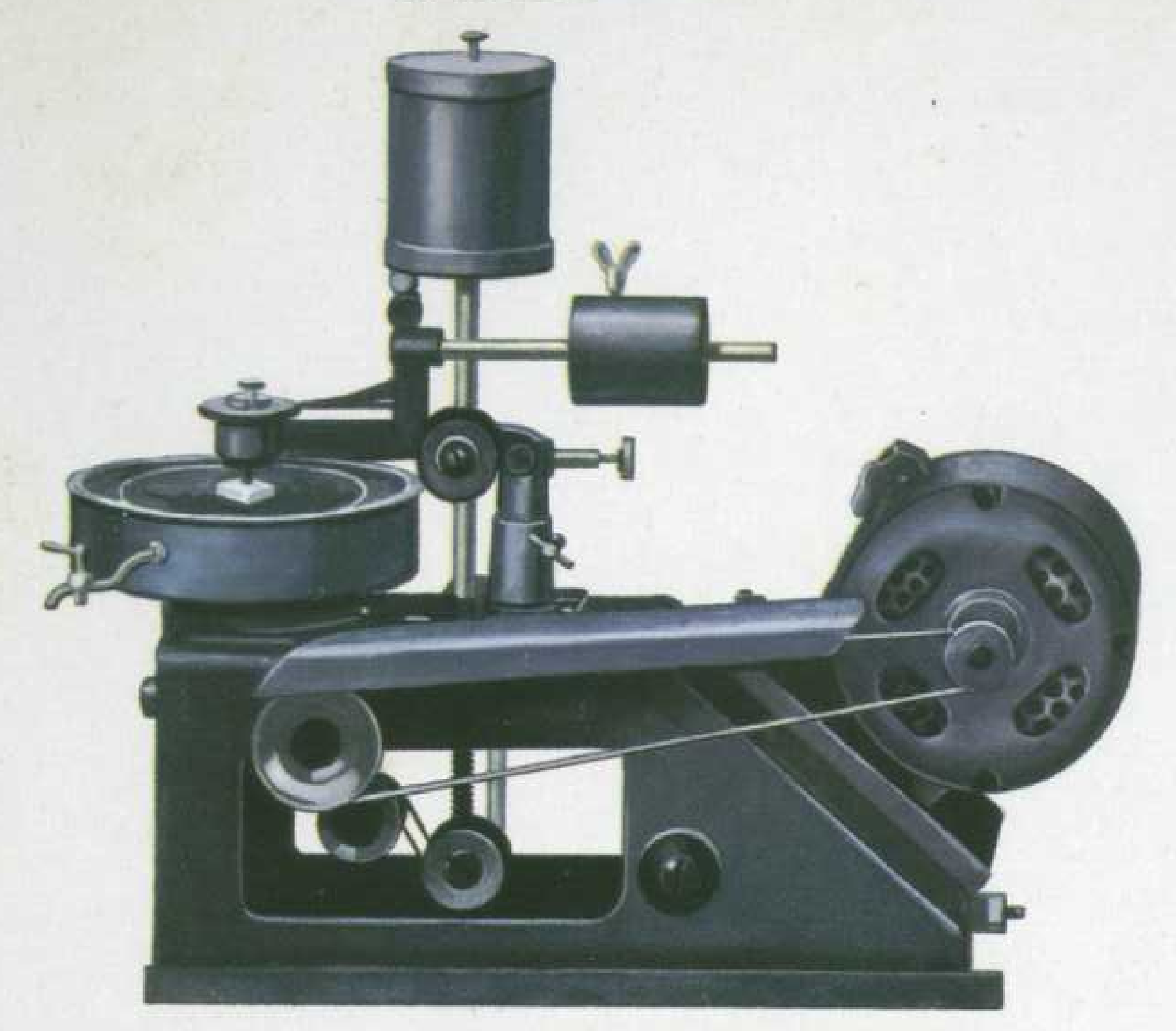


Fig. 1. — Aparato para el pulimento de metales.

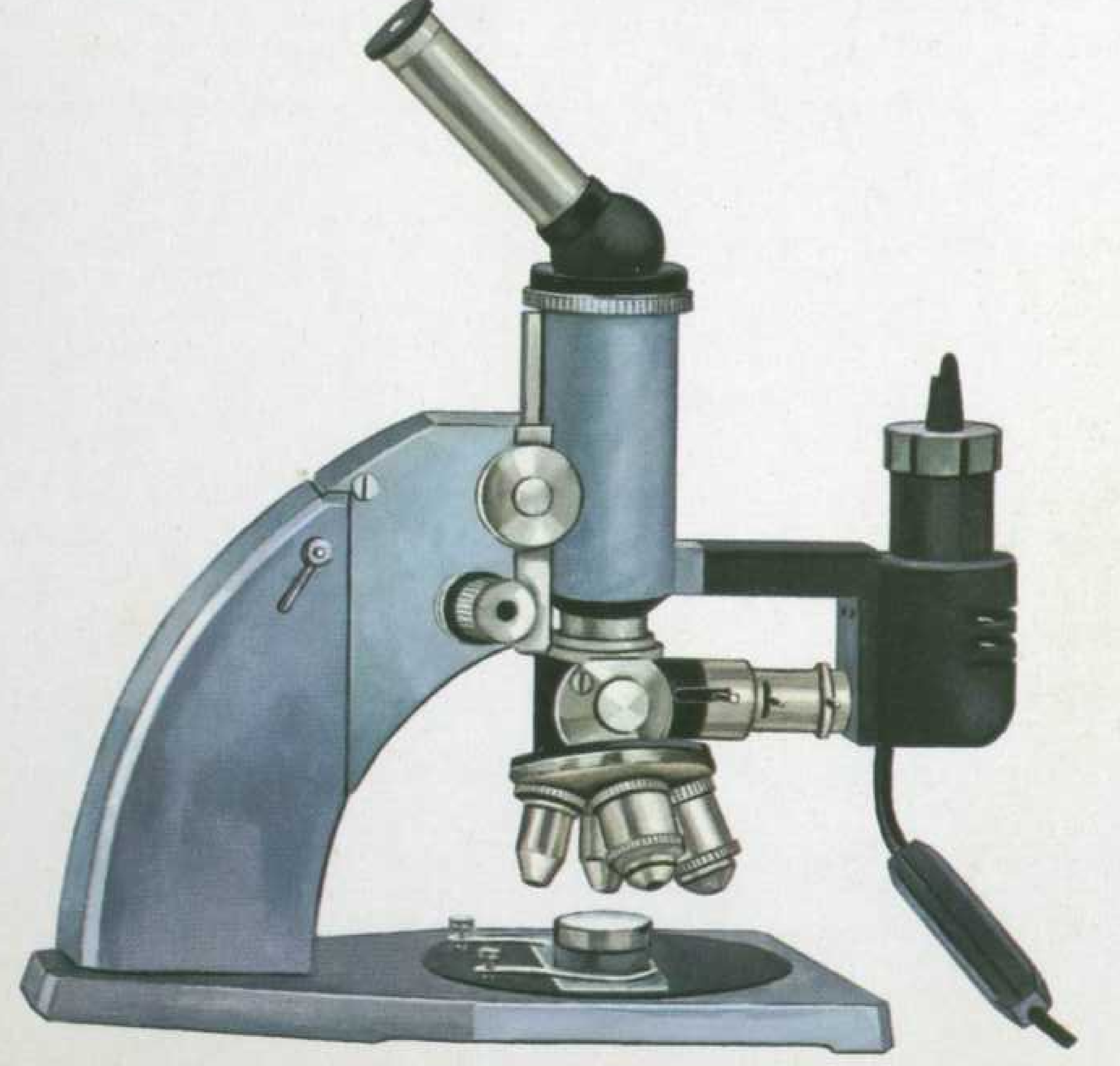


Fig. 2. — Microscopio metalográfico de taller con protección contra el polvo y las vibraciones.

REACTIVOS Y COLORANTES

a) Constitución de los aceros:

Alcohol etílico . . . . . 100 gr.
Ácido pícrico puro . . . 4 »

b) Coloración de ciertos aceros:

Alcohol etílico . . . . . 100 gr.
Ácido pícrico . . . a saturación

c) Cementita de los aceros; ciertos carburos complejos que se encuentran en aceros especiales:

Ácido pícrico . . . . . 2 gr.
Sosa (36º Baumé) . . . 25 »
Agua destilada . . . . . 100 ml.

El ácido pícrico se disuelve en agua caliente, a la que se añade lentamente la sosa.

d) Reactivo para descubrir los carburos complejos de los aceros especiales con alto contenido de elementos extraños (aceros al cromo y al tungsteno).

Ácido crómico . . . . . 2 gr.
Ácido sulfúr. (68º Baumé). 25 ml.

Se emplea en caliente.

e) Granos de aceros y aleaciones de cobre.

Se utiliza con éxito el cobre amoniacal.

Se precipita con amoníaco una solución de sulfato de cobre. Se añade una pequeña cantidad de amoníaco hasta que se disuelve el precipitado.

Aleación antifricción:

Nitrato de plata . . . . 2 gr.
Agua destilada . . . . . 100 »

Se forma en la superficie de la aleación que se va a estudiar un acopio negro, que luego es preciso eliminar con un chorro de agua.

MÉTODO HISTOLÓGICO

Los metales pueden estudiarse también por el método de los cortes en serie. La pieza que se va a estudiar se fija en un portaobjetos y se coloca en una platina provista de un tornillo micrométrico que permita medir los diferentes planos que el pulimento sucesivo nos irá mostrando. Para ello ha de colocarse la pieza siempre exactamente en el mismo punto del estativo del microscopio, lo cual permitirá reexaminarla tantas veces como se haya aumentado el espesor de la preparación con arreglo a las cifras dadas por el micrótomo. Los espesores de las capas rebajadas sucesivamente por los pulimentos se determinan por medio del micrómetro objetivo.

EXAMEN DE POLVOS METÁLICOS

La parafina se emplea como soporte para pulir estos polvos. Los discos empleados para el pulimento tienen estriada su cara plana. Se vierte la parafina fundida encima de estos platos calentados a 100º, y es retenida por un anillo o banda móvil. Las partículas que se van a examinar se incorporan a la parafina antes de que ésta se solidifique. Cuando se ha endurecido, la mezcla se pule con esmeriles de diferente grosor mezclados con una pasta acuosa. Para terminar el pulimento se emplea rojo de Inglaterra.

Se necesita un poco de agua durante el pulimento, para evitar calentamientos.

APARATOS DE OBSERVACIÓN

Los minerales metálicos pulidos (figura 1) se examinan por medio de microscopios metalográficos. Las muestras, fijadas encima de un portaobjetos metálico mediante cera o plasticina, se colocan en la platina de un microscopio ordinario provisto de un iluminador vertical. La superficie pulida que examinamos debe ser paralela al plano de la platina del microscopio.

Si se utiliza luz eléctrica, para corregir el color amarillo dominante se interpondrán filtros azules, que pueden ser láminas de vidrio o frascos llenos de soluciones coloreadas.

DISPOSITIVOS PARA EL EXAMEN CON LUZ POLARIZADA

Se emplearán los dispositivos normales de polarización (fig. 3): nicol polarizador, que se adapta al tubo iluminador, y nicol analizador, que se adapta al tubo ocular.

Es preciso emplear lámparas de 1.000 ó 1.500 bujías. Es necesario, además, seguir exactamente las normas establecidas.

Las secciones deben ser exactamente perpendiculares al eje del microscopio. El pulimento debe ser uniforme; las estrías o rayaduras producen efectos de polarización del todo insospechados que dificultan la observación. Las preparaciones fuertemente atacadas por los reactivos son inutilizables. El pulimento forma una película superficial cuya influencia en los fenómenos de polarización permanece hasta hoy desconocida. (Fig. 2.)

METALOGRAFIA







Fig. 1. — Preparaciones de minerales metálicos. En A, el mineral azul es sulfuro de cobre, y el blanco, pirita. En B, desplazamiento del sulfuro de cobre (calcosina) por la covelita. En C, blenda con finas inclusiones de calcopirita.





Fig. 2. — Aleaciones metálicas: plata y antimonio. En A, con luz natural; en B, con luz polarizada.



Fig. 3. — Microscopio polarizante.

PRODUCTOS ANIMALES

LIPIDOS

Reacción de las grasas. Los objetos que contengan grasas animales se fijan en formol al 10 por 100, y los cortes, efectuados mediante un micrótomo de congelación, se sumergen durante cinco o diez minutos en una solución acuosa de crisoidina al 1 por 100. Después de lavados, los cortes se introducen en ácido crómico al 10 por 100 o en bicromato potásico. Se lavan y finalmente se procede a su montaje.

Otro sistema consiste en teñir los cortes con Sudán III en alcohol de 70º Se montan en glicerina. Los glóbulos grasos se tiñen de rojo anaranjado.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LA LECHE

Recuento de bacterias. Con ayuda de una pipeta graduada, de 0 a 0,01 mililitros, se toma esta misma cantidad de leche y se extiende en una lámina de vidrio de un centímetro de lado. Se seca suavemente y se tiñe por medio de azul de metileno de Breed-Newman:

Alcohol de 96º . . . . . 54 ml.
Tetracloretano . . . . . 40 »

Se calienta con precaución a 70º C y se añade:

Azul de metileno . . . . 1,2 gr.

Se agita hasta que se disuelve el colorante. Se deja enfriar y se añade:

Acido acético glacial . . 6 ml.

Se filtra.

Se observa con objetivo de inmersión. Se cuentan las bacterias en un cierto número de campos. Se calcula la superficie de estos campos y la cantidad de leche que corresponde a esta superficie.

El recuento directo permite conocer rápidamente la causa de un aumento microbiano. (Fig. 1.)

Bacterias

Se toman 25 mililitros de leche, a los cuales se añaden 50 mililitros de agua destilada. Se pone todo en un tubo de centrífuga y se centrifuga a 5.000 revoluciones por minuto. Se separan la crema y el suero, y se extienden separadamente en dos portas. Se tiñen por el método de Ziehl-Neelsen.

Los bacilos acidorresistentes, el de Koch y el de Hansen, así como los paratuberculosos, se tiñen de rojo; los demás elementos celulares que no sean acidorresistentes se tiñen de azul.

Otro método muy interesante es la tinción con nigrosina. Se pone en un porta una gota del líquido que se va a examinar, se mezcla con una gota de nigrosina, se deja secar y se examina en inmersión.

Si la cantidad de nigrosina fuera excesiva, no se vería nada; por el contrario, si es la adecuada, entre las gotitas de grasa y las de suero se observan puntos oscuros, que son las bacterias.

EXAMEN MICROSCÓPICO DEL QUESO

Se pone en un mortero de porcelana esterilizado, previamente calentado a 45º C, un gramo de queso. Se muele con cuidado. También con cuidado se añade, gota a gota, un centímetro de solución al 20 por 100 de citrato sódico, esterilizada, a la que se agregan luego ocho mililitros de agua esterilizada, a la temperatura de 45º. Se obtiene un líquido cremoso, sin grumos, en el cual está emulsionada la materia grasa del queso. Se diluye esta emulsión en diez partes de alcohol de 50º ligeramente alcalino, al cual se adiciona fenolftaleína, que virará al rojo (pH 8,5 aproximadamente). De esta solución se toma 0,01 miligramos y se extiende en una superficie de un centímetro cuadrado. Se seca y se fija en una solución de cloruro cálcico al 2 por 100.

Se tiñe con azul de metileno de Breed-Newman al 1 por 100.

Este procedimiento permite observar la flora microbiana de la leche y del queso (fig. 2) y determinar la morfología de las especies en ellos presentes.

En la leche y en sus productos se encuentra gran variedad de bacterias (figura 1). Citaremos las más corrientes: *Streptococcus lactis*, grampositivo; *Lactobacillus acidophilus*, grampositivo; *Lactobacillus bulgaricus*, grampositivo; *Lactobacillus casei*, también positivo; *Mycobacterium tuberculosis*, acidorresistente; *Serratia marcescens*, gramnegativo; *Bacillus subtilis*, grampositivo; *Bacillus cereus*, grampositivo; *Bacillus mesentericus*, igualmente de carácter grampositivo.

PRODUCTOS ANIMALES

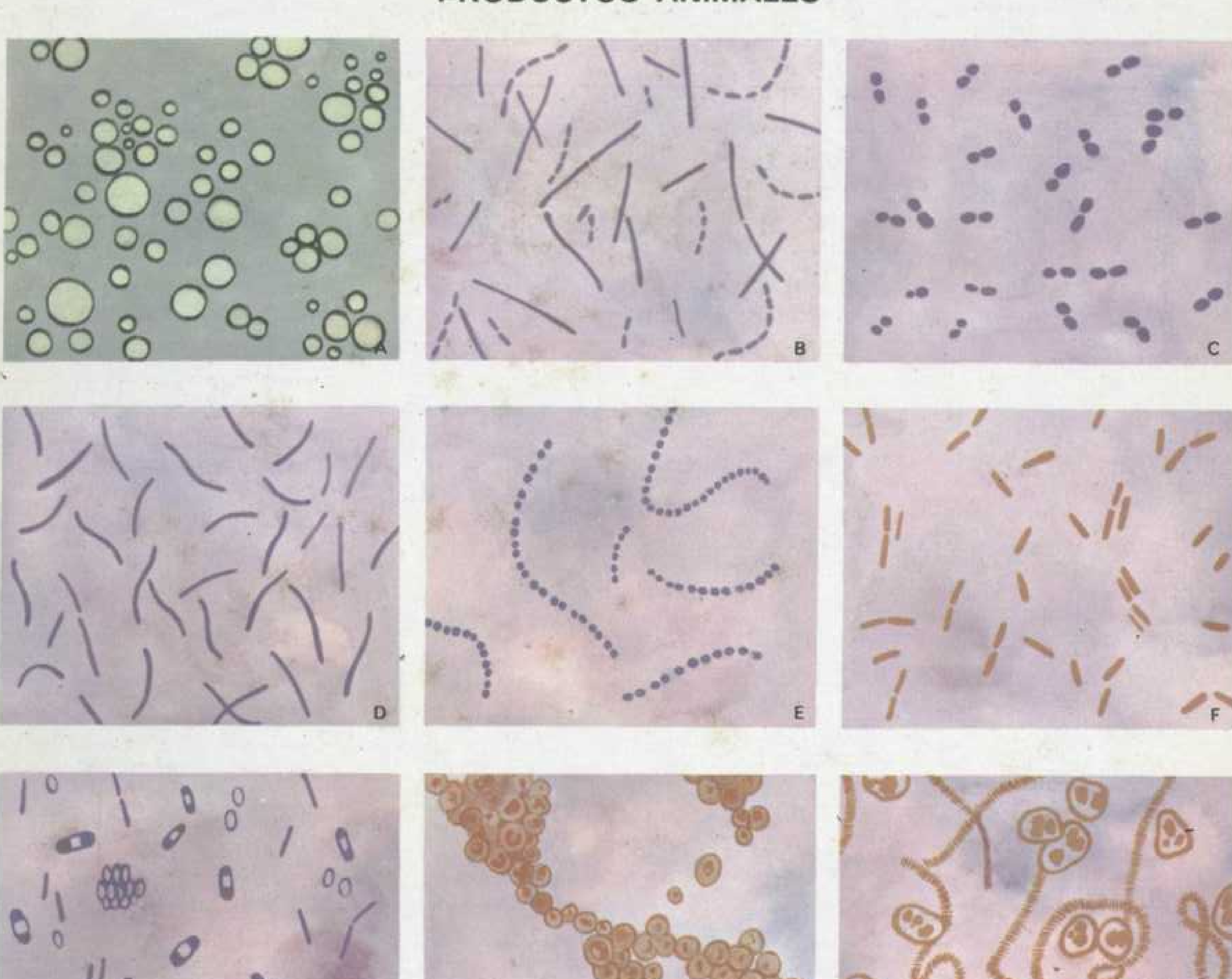


Fig. 1. — Análisis bacteriológico de la leche. A, glóbulos de grasa; B, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus lacticus*; C, *Lactobacillus acidiophilus*; D, *Lactobacillus casei*; E, *Streptococcus cremoris*; F, *Lactobacillus caucasicus*; G, *Bacillus subtilis*; H, *Torula amara*; I, *Streptococcus mastitidis*.



Fig. 2. — Queso de Rochefort, aumentado, en el que se observan las hifas del hongo *Penicillium rochefortii* en medio de las manchas oscuras.

MICROFLUORESCENCIA

Se construyen microscopios especiales de fluorescencia, aunque también es posible emplear microscopios normales con iluminación por transmisión. Deséchense los objetivos a la fluorina, pues las lentes son de por sí fluorescentes y alterarían el resultado.

El ocular debe estar provisto de un filtro que impida el paso de los rayos ultravioletas a través del microscopio, pues éstos podrían dañar la vista. (Figura 1.) La preparación se monta en un líquido no fluorescente, agua o glicerina, sobre portas perfectamente limpios, de vidrio impermeable a los rayos ultravioletas, y, además, no rayados.

Debe utilizarse un aceite de inmersión especial, pues el aceite de cedro es fluorescente.

Hay dos clases de fluorescencia: la que es propia de ciertos objetos o de determinados líquidos, fluorescencia primaria, y la que adquieren los objetos por impregnación con sustancias fluorescentes.

La fluorescencia primaria puede poner de manifiesto las diferencias de coloración entre diversos tejidos. Los objetos que se han de observar no deben sufrir ninguna manipulación, salvo la fijación en formol (vapor o líquido). El material se cortará directamente sin inclusión o por el método de congelación.

Los tejidos vegetales ofrecen coloraciones muy contrastadas, sobre todo las cutículas y los haces vasculares de los tejidos esclerificados. (Figs. 2 y 3.)

La clorofila y la carotina son patentes en alto grado.

La fluorescencia secundaria aparece cuando los objetos han sido tratados con soluciones de sustancias fluorescentes o fluorocromas.

Se someten las preparaciones a la acción de soluciones muy diluidas (1 por 1.000 a 1 por 5.000.000), al igual que para las coloraciones histológicas (figuras 2-4), las cuales provocan fluorescencias selectivas.

No deben emplearse a la vez dos o más fluorocromos. La acción dura de algunos minutos a varias horas, según la dilución empleada. Las soluciones fluoroscópicas se conservan, al abrigo de la luz, en frascos de color topacio bien cerrados.

Para el estudio de las preparaciones vegetales se emplean soluciones concentradas (1 por 1.000 al 1 por 100.000), a las cuales se deja actuar durante el breve tiempo de cinco a quince minutos.

Los núcleos se tratan con extracto de ruibarbo, rojo escarlata o sulfato de berberina. Los tejidos quitinizados v suberificados se tratan con una tintura de clorofila.

Se emplean soluciones frescas. No es conveniente conservar las preparaciones, pues la fluorescencia se altera con el tiempo.

Las imágenes obtenidas con el microscopio fluorescente son mucho más brillantes que las logradas con luz ordinaria.

Hasta el presente no se han utilizado todas las posibilidades del microscopio fluorescente porque exige el empleo de rayos luminosos de gran potencia para iluminar debidamente las preparaciones. Algunos investigadores emplean lámparas de arco que producen radiaciones particularmente ricas entre los 3.000 y los 4.000 Å. Las potencias luminosas empleadas permiten las más fuertes ampliaciones, incluso las obtenidas con objetivos de inmersión.

Este método permite examinar preparaciones y estructuras, así como determinaciones químicas, sin manipulaciones y coloraciones previas o, en ciertos casos, con preparaciones muy simplificadas.

Ello permite abreviar el tiempo de preparación y la observación, y, sobre todo, poner de manifiesto detalles estructurales que escaparían a la observación practicada con los métodos clásicos.

Las coloraciones son características de determinados cuerpos.

MICROFLUORESCENCIA

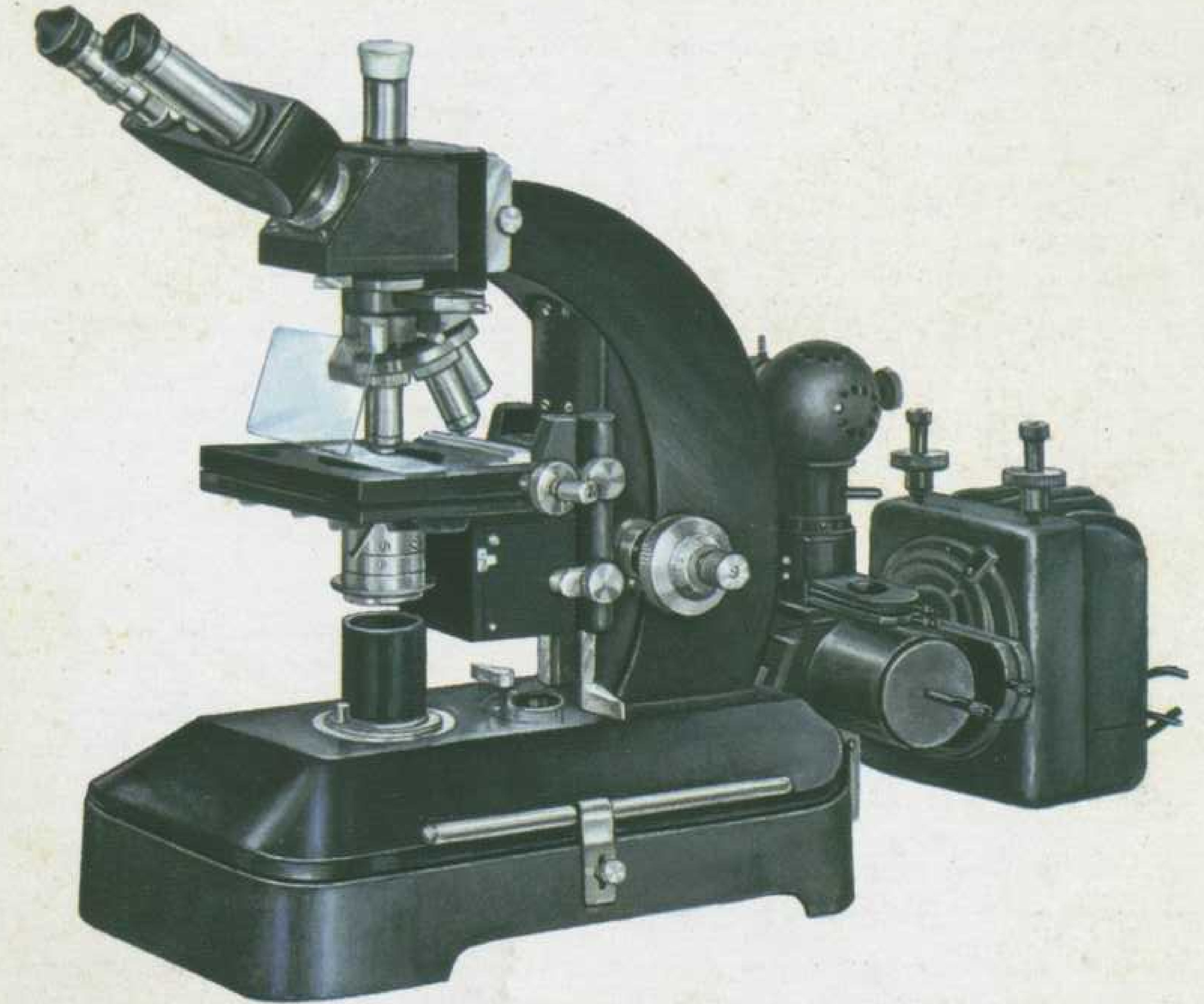


Fig. 1. — Microscopio Reichert con dispositivo especial de iluminación para la observación de la microfluorescencia.



Fig. 2. — Corte de un tallo de *Berberis* con fluorescencia.

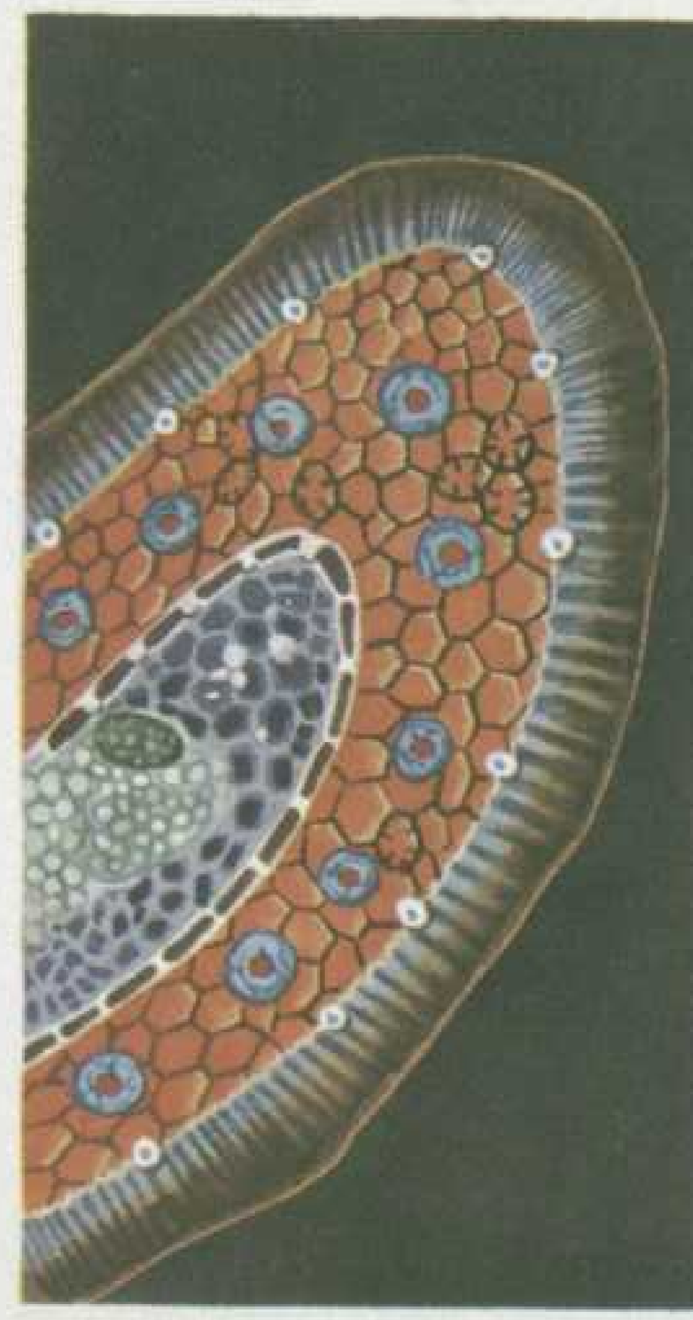


Fig. 3. — Corte de una hoja de pino con fluorescencia azul.



Fig. 4. — Tejido de la base de la lengua humana.

CUADRO DE MATERIAS

INDICE

La ilustración de esta obra ha sido dirigida por don Santiago Prevosti Pelegrín.

Los originales de las láminas fueron ejecutados por los siguientes dibujantes:

Don Martín Martínez Navarro: láms. A/2, B/1, B/3, B/4, B/8, C/2, C/4, D/1, D/2, D/3, D/4, D/5, D/6, D/7, D/8, E/1, E/2, E/3, E/4, E/7, E/8, G/1, H/1, H/2 y I/6.

Don Santiago Prevosti Pelegrín: láms. A/1, B/2, B/5, B/6, B/7, C/1, C/3, E/5, E/6, F/1, F/2, I/1, I/2, I/3, I/4, I/5 y I/7.

Agradecemos muy sinceramente la colaboración de ENOSA, por la cesión de las diapositivas de microscopios que aparecen en la obra.


ISBN 84-7093-138-5
9 788470 931383

EDICIONES JOVER, S. A. - BARCELONA

ATLAS DE MICROSCOPIA

J. Bernis Mateu

EDICIONES JOVER